

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Producción de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes* a
partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos
urbanos mediante electrosíntesis microbiana**

Tesis
Que presenta
Eduardo Hernández Correa

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de la Tesis: Dr. Héctor M. Poggi Varaldo
Codirector de la Tesis: Dra. María Teresa Ponce Noyola

Para el desarrollo de esta tesis de Maestría se tuvo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), el número de beca asignado fue el 590209.

El trabajo de esta tesis se realizó en los laboratorios “Dr. Fernando José Esparza García”, “QFB Elvira Ríos Leal” del Grupo de Biotecnología Ambiental y Energías Renovables (GBAER) y 17 (Genética Microbiana). Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, bajo la dirección mancomunada del Dr. Héctor M. Poggi Varaldo y la Dra. María Teresa Ponce Noyola.

Comité tutorial

Dr. Héctor M. Poggi Varaldo (1) (director mancomunado)

Dra. María Teresa Ponce Noyola (2) (directora mancomunada)

Dr. Omar Solorza Feria (3) (asesor)

Dr. Giovanni Hernández Flores (4) (asesor)

Cand. Dra. Leticia Romero Cedillo (5) (asesora extraordinaria)

(1) CINVESTAV del IPN, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Laboratorios “Dr. Fernando José Esparza García” y “QFB Elvira Ríos Leal”, Grupo de Biotecnología Ambiental y Energías Renovables.

(2) CINVESTAV del IPN, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Laboratorio de Genética Microbiana.

(3) CINVESTAV del IPN, Departamento de Química.

(4) CONACYT-Universidad Autónoma de Guerrero, Escuela Superior de Ciencias de la Tierra.

(5) CINVESTAV del IPN, Programa de Doctorado en Nanociencias y Nanotecnología. Laboratorios “Dr. Fernando José Esparza García” y “QFB Elvira Ríos Leal”, Grupo de Biotecnología Ambiental y Energías Renovables.

AGRADECIMIENTOS

A las siguientes empresas y personas les agradezco su apoyo técnico y/o asesoría para la realización del presente proyecto:

A Zoetis, al Ingeniero Isaac Fermon (director de la empresa QUÍMICA Y ALIMENTACIÓN, S.A. DE C.V.) y al Dr. Carlos Boy Gerente de MFA's Unidad Avícola por generosamente proporcionar una muestra de producto AVATEC®, el cual contiene el antibiótico Lasalocid sódico, ocupado durante la actividad 5.4.

A CEPIPSA, UNAM y al director, el Dr. Javier Gutiérrez Molotla por facilitarnos una muestra de rumen de caprino.

A la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares, al Biól. Juan Carlos Estrada Mora y Dr. Daniel A. Estrada Bárcenas por la secuenciación del producto de PCR de la bacteria aislada en la actividad 5.4. denominada *Caprina EHC* en este trabajo.

Al Laboratorio Avanzado de Nanoscopía Electrónica y al Dr. Isaac Hernández Calderón y Dr. Jorge Roque De La Fuente por su participación en las observaciones de las muestras realizadas por el Microscopio Electrónico de Barrido.

Al Laboratorio de Rayos X, de la Sección de Electrónica del Estado Sólido del departamento de Ingeniería Eléctrica, CINVESTAV, en especial al Dr. Adolfo Tavera Fuentes por su participación en la obtención del patrón de la difracción de rayos X de las muestras de la actividad 5.2.2.

A la Central Analítica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV, QFB Elvira Ríos Leal, Gustavo G. Medina Mendoza y Oscar I. Rojas Gómez por la cuantificación de H₂Succ, en la actividad 5.4 a través de HPLC-RID, y la determinación de ácido levulínico y HMF en la actividad 5.2.2.

Al taller del CINVESTAV, Ing. Raúl Guzmán Ruiz, al Ing. Armando Barbosa por la construcción de las celdas de electrosíntesis microbianas.

Al Ing. Mecatrónico Abimael Champo Vázquez de la Unidad Profesional Interdisciplinaria en Ingeniería y Tecnologías Avanzadas del IPN por el dibujo de los planos de la celda de electrosíntesis microbiana a partir del diseño del Biól. E. Hernández Correa y del Dr. Héctor M. Poggi Varaldo.

A la M. en C. Odilia Pérez Avalos, Auxiliar de Investigación del laboratorio de Genética Microbiana del Departamento de Biotecnología, CINVESTAV por su invaluable asistencia en la determinación de analitos en el HPLC, en técnicas de biología molecular, mantenimiento y preservación de cultivos celulares, y sobre todo por compartir su experiencia en la investigación.

Al M. en C. Rafael Hernández Vera Auxiliar del laboratorio “QFB Elvira Ríos Leal” del Departamento de Biotecnología, CINVESTAV por su apoyo y suministro del material de laboratorio bajo resguardo.

Al Cand. Dr. Abdi Sánchez Escalante del laboratorio de bioprocesos del Departamento de Biotecnología, CINVESTAV por su asesoría y su gran participación en el montaje y funcionamiento de los dispositivos electrónicos para el monitoreo de los dispositivos bioelectroquímicos.

A Giovani Mercado Valle de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por su colaboración durante el servicio social participando en las actividades 5.2.2. y 5.4.

Al Cand. M. en C. Mario A. Reyes Hernández, del Departamento de Biología Celular por facilitar el acceso al termociclador con capacidad de realizar gradientes de temperatura en la actividad 5.4.

A la Cand.Dra. Miriam Téllez Cruz del Departamento de Química por su ayuda en la determinación del área superficial del cascarón de huevo por adsorción con nitrógeno en la actividad 5.2.2.

A los técnicos del laboratorio Lic. Verónica Soto Bellosa del laboratorio 17 “Genética Microbiana”, por su apoyo esterilizando material. Y al técnico del laboratorio Lic. David Portilla Silva de los laboratorios “Dr. Fernando José Esparza García” y “QFB Elvira Ríos Leal” por mantener disponibles los instrumentos de laboratorio requeridos, estar al pendiente del equipo del laboratorio y corregirnos sobre el uso de los mismos. Ambos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.

A la Asistente secretarial de Coordinación Académica C. Vania Yamile Muñoz Macías y a la secretaría administrativa C. María Alejandra Sinecio Moreno del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, por su apoyo en la realización de numerosos trámites antes, durante y después de mi estancia en el Departamento

A mis profesores, mi familia y mis amigos.

CRÉDITOS Y AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	xii
Letras griegas	xv
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	5
1.1. Ácido succínico	5
1.2. Sistemas bioelectroquímicos.....	10
1.2.1. Celdas de combustible microbiana	10
1.2.2. Celdas de electrosíntesis microbiana.....	11
1.3. Separación de ácido succínico del medio de cultivo	19
1.4. Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos como fuente de	
carbono para la producción de ácido succínico	20
1.4.1. Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en México	20
1.4.2. Otras consideraciones.....	20
1.5. Destoxificación del hidrolizado ácido de la fracción orgánica de	
residuos sólidos urbanos	22
2. JUSTIFICACIÓN.....	23
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	25
5. METODOLOGÍA	26
5.1. Plan de trabajo.....	26
5.2. Actividades.....	27
5.2.1. Evaluación de pretratamiento de la fracción orgánica de residuos	
sólidos orgánicos para la obtención de azúcares reductores y técnicas de	
caracterización	27
5.2.1.1. Propósito	27
5.2.1.2. Diseño experimental.....	27
5.2.1.3. Programa de seguimiento y análisis.....	27
5.2.1.4. Procedimientos y técnicas.....	28
5.2.1.4.1 Preparación de la FORSU.....	28
5.2.1.4.2. Determinación de la relación de la carga FORSU con el	
volumen de ácido diluido.....	28

5.2.1.4.3. Tratamiento ácido diluido	29
5.2.2. Determinación del comportamiento adsorptivo del cascarón de huevo en polvo	31
5.2.2.1. Propósito	31
5.2.2.2. Diseño experimental.....	31
5.2.2.3. Programa de seguimiento y análisis.....	32
5.2.2.4. Procedimientos y técnicas.....	33
5.3. Diseño y construcción de una celda de electrosíntesis microbiana para la producción de ácido succínico	34
5.3.1. Propósito	34
5.3.2. Características de la celda de electrosíntesis microbiana.....	34
5.4. Aislamiento de un microorganismo productor de ácido succínico de rumen de caprino e Identificar el organismo aislado mediante el análisis de la subunidad ribosomal 16s y pruebas bioquímicas.....	37
5.4.1. Propósito	37
5.4.2. Diseño experimental	37
5.4.3 Programa de seguimiento y análisis	37
5.4.4. Procedimientos y técnicas.....	37
5.4.4.1. Muestras de rumen	37
5.4.4.2. Condiciones del cultivo.....	38
5.4.4.3. Cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos.....	39
5.4.4.4. Identificación de producción de hidrógeno	39
5.4.4.5. Secuenciación de la subunidad ribosomal 16s	39
5.5. Evaluación de la producción de ácido succínico a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos mediante una celda de electrosíntesis microbiana evaluando <i>Nafion versus</i> agar como separadores o <i>A. succinogenes versus</i> <i>Caprina EHC</i> como biocatalizador.	40
5.5.1. Propósito	40
5.5.2. Diseño experimental	41
5.5.3 Programa de seguimiento y análisis	42
5.5.4. Procedimientos y técnicas.....	42
5.5.4.1. Microorganismo y preparación del inóculo.....	42
5.5.4.2. Composición de medio en celda de electrosíntesis	43
5.5.4.3. Síntesis de la membrana de agar al 2%.....	43
5.5.4.4. Condiciones de la fermentación	44

5.6. Determinación de los requerimientos energéticos (térmicos y eléctricos) para operar la celda de electrosíntesis microbiana a 37 °C durante el tiempo de operación e índices de desempeño	46
5.6.1. Propósito	46
5.6.2. Procedimientos y técnicas.....	46
6. Resultados y discusión	49
6.1. Evaluación del pretratamiento ácido diluido de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos y evaluación del cascarón de huevo en polvo como adsorbente de compuestos inhibidores formados durante el pretratamiento ácido diluido	49
6.1.1. Evaluación de pretratamiento ácido diluido de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos para la obtención de azúcares reductores.....	49
6.1.2. Destoxificación del hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos cascarón de huevo en polvo.....	54
6.1.2.1. Destoxificación por sobre-adición de $\text{Ca}(\text{OH})_2$	54
6.1.2.2. Características del cascarón de huevo en polvo.....	56
6.1.2.3. Tamaño de partícula del cascarón de huevo en polvo.....	58
6.1.2.4. Diámetro del poro del cascarón de huevo en polvo	58
6.1.2.5. Experimentos de adsorción con cascarón de huevo en polvo	60
6.1.2.6. Cinéticas de adsorción de compuestos fenólicos por el cascarón de huevo en polvo	60
6.2.1. Análisis de los datos de las cinéticas de adsorción de compuestos fenólicos por el cascarón de huevo en polvo	61
6.1.2.8. Remoción de ácido levulínico y HMF presentes en hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos por cascarón de huevo en polvo	62
6.1.2.9. Parámetros de isothermas de adsorción de compuestos fenólicos presentes en hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos	65
6.2. Diseño y construcción de una celda de electrosíntesis microbiana para la producción de ácido succínico.....	67
6.3. Aislamiento e identificación de un organismo productor de ácido succínico a partir de rumen de caprino.....	67
6.4. Evaluación de la producción de ácido succínico a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos mediante una celda de electrosíntesis microbiana evaluando Nafion <i>versus</i> agar como separadores o <i>A. succinogenes versus Caprina EHC</i> como biocatalizador.	73

6.4.1. Evaluación una membrana de intercambio protónico de bajo costo y contraste de su eficiencia con una membrana de Nafion.....	73
6.4.1.1. Producción de ácido succínico por <i>A. succinogenes</i> a partir de hidrolizado de FORSU en una celda de electrosíntesis microbiana con bicarbonato de sodio como fuente de CO ₂ y pH anódico de 7.2.....	73
6.4.1.2. Producción de ácido succínico por <i>A. succinogenes</i> a partir de hidrolizado de FORSU en una celda de electrosíntesis microbiana con carbonato de magnesio como fuente de CO ₂ y pH anódico de 3.....	76
6.4.2. Producción de ácido succínico por <i>Caprina EHC</i> en una celda de electrosíntesis microbiana.....	82
6.5. Determinación de los requerimientos energéticos (térmicos y eléctricos) para operar la CESIM a 37 °C durante el tiempo de fermentación.....	83
6.5.1. Capacidad calorífica y densidad relativa del medio de cultivo.....	84
6.5.2. Energía total requerida por la electrofermentación.....	86
6.5.2.1. Energía por calefacción.....	86
6.5.2.2. Energía eléctrica.....	87
6.5.2.3. Energía de mezclado.....	87
7. CONCLUSIÓN.....	97
8. REFERENCIAS.....	101
ANEXOS.....	108
Anexo 1. Caracterización de hidrolizado y residuo sólido de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos.....	109
1.1. Caracterización del hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos.....	109
1.1.1. Determinación de pH.....	109
1.1.2. Determinación de azúcares reductores.....	109
1.1.3. Determinación de fenoles totales.....	110
1.2. Determinación de solidos restantes del hidrolizado de FORSU.....	111
1.2.1. Determinación de celulosa.....	111
1.2.2. Determinación de hemicelulosa.....	111
1.2.3. Determinación de lignina.....	112
Anexo 2. Otros ensayos de deslignificación e hidrólisis de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos.....	114
2.1. Tratamiento alcalino con NaOH.....	114
Anexo 3. Determinación de cloro libre.....	116

3.1 Reactivos	116
3.2. Estandarización de la solución de tiosulfato de sodio al 0.1 M	116
3.3. Procedimiento para determinar el porcentaje de cloro	117
Anexo 4. Secuencia de la subunidad 16s de <i>Caprina EHC</i>	118
Anexo 5. Cromatogramas de los compuestos analizados	119
Anexo 6. Tablas de Análisis de Varianza del experimento de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos.	122
Anexo 7. ANOVA sección electrofermentación	125
Anexo 8. Cálculo de energía consumida por la celda de electrosíntesis microbiana.....	129
Anexo 9. Código para programación en Arduino para el monitoreo de voltaje en las electrofermentaciones mediante celdas de electrosíntesis microbianas.....	134

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del ácido succínico	6
Tabla 2. Producción de ácido succínico por diferentes microorganismos.....	9
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del rojo neutro.....	14
Tabla 4. Producción de compuestos de valor agregado y commodities selectos.	15
Tabla 5. Composición de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos para México.....	21
Tabla 6. Parámetros de análisis y caracterización de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos.....	27
Tabla 7. Parámetros de análisis y caracterización del hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos.....	28
Tabla 8. Niveles experimentales de las dos variables independientes	31
Tabla 9. Formas linealizadas y no linealizadas de los modelos cinéticos de adsorción.....	32
Tabla 10. Caracterización de los hidrolizados destoxificados	32
Tabla 11. Parámetros de análisis de producción de ácido succínico de microorganismos aislados a partir de rumen de caprino.....	37
Tabla 12. Diseño experimental para evaluar el tipo de separador y el microorganismo empleado en la producción de ácido succínico a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos	42
Tabla 13. Parámetros de análisis de producción de ácido succínico en celda de electrosíntesis microbiana a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos	42
Tabla 14. Caracterización de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos antes y después de ser tratada con H ₂ SO ₄ al 4% por 17 min a 121 °C a 15 psi.....	50
Tabla 15. Diseño factorial con cinco puntos centrales (valores codificados y reales) con la cantidad de azúcares reductores obtenidos como respuesta	50
Tabla 16. Obtención de azúcares reductores basados en los resultados del diseño factorial 2 ² con cinco puntos centrales	51
Tabla 17. Diseño experimental y resultados del paso de ascenso.....	52
Tabla 18. Relación FORSU:ácido diluido y tiempo	53
Tabla 19. Características del hidrolizado no destoxificado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos	54
Tabla 20. Propiedades físicas y químicas del cascarón de huevo en polvo	56

Tabla 21. Moda, mediana, valor mínimo y máximo y promedio del tamaño de partícula de cascarón de huevo antes y después de la adsorción.....	58
Tabla 22. Parámetros de modelos cinéticos de la adsorción de compuestos fenólicos sobre cascarón de huevo en polvo a pH 3, 6 y 9.....	64
Tabla 23. Parámetros de isoterma de adsorción de compuestos fenólicos sobre cascarón de huevo en polvo.	66
Tabla 24. Producción de ácido succínico por cepas aisladas a partir de rumen de caprino después de 24 h de fermentación.....	67
Tabla 25. Identidad de la subunidad ribosomal 16s entre la bacteria aislada y las bacterias relacionadas.....	70
Tabla 26. Producción de ácido succínico, rendimiento y relación con compuestos concomitantes.....	77
Tabla 27. Rendimiento y pseudorendimiento de la producción de ácido succínico de los tratamientos evaluados.....	84
Tabla 28. Dimensiones y parámetros de operación de la celda de electrosíntesis microbiana.....	85
Tabla 29. Masa de ácidos orgánicos producidos y requerimientos energéticos de la electrofermentación y la fermentación convencional de los distintos tratamientos.....	95
Tabla 30. Detalle de masas de compuestos concomitantes obtenidas en los cuatro tratamientos y tres controles.....	96

Índice Tablas Anexo

Tabla 2.1. Azúcares reductores liberados durante la hidrólisis ácida a 121 °C y 15 psi a diferentes tiempos y concentraciones de H ₂ SO ₄	115
Tabla 6.1. Análisis de varianza de factorial 2 ² H ₂ SO ₄ (%) y Tiempo (min) con cinco puntos centrales como variable de respuesta azúcares reductores	122
Tabla 6.2. Análisis de varianza los fenoles remanentes en hidrolizado de FORSU por CHP, pH y tiempo de contacto	122
Tabla 6.3. Análisis de varianza cinética de remoción de azúcares reductores en hidrolizado de FORSU por CHP, pH y tiempo de contacto	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación estequiométrica de la fermentación de hexosas y pentosas para la producción de ácido succínico. H: equivalentes reductores (H: NADH/NADPH/FADH ₂); PEP: fosfoenolpiruvato.....	8
Figura 2. Tipos de sistemas bioelectroquímicos	10
Figura 3. Sistemas bioelectroquímicos (A) con producción de electricidad.....	11
Figura 4. Plan de trabajo.....	26
Figura 5. Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos.....	29
Figura 6. Diagramas de conexiones de la celda de electrosíntesis microbiana. ...	35
Figura 7. Configuración de la celda de electrosíntesis microbiana.	36
Figura 8. Azúcares presentes en hidrolizado destoxificado con carbón activado al 2% cuantificado por HPLC-RID.....	53
Figura 9. Compuestos fenólicos remanentes en hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos tratados con sobre-adición de Ca(OH) ₂ a pH 3, 6, 9 y 11.....	55
Figura 10. Azúcares reductores remanentes en hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos tratados con sobre-adición de Ca(OH) ₂ a pH 3, 6, 9 y 11.....	55
Figura 11. Patrón de difracción de rayos X de cascarón de huevo en polvo.	57
Figura 12. Micrografías de microscopía electrónica de barrido ilustrando los poros del cascarón de huevo en polvo.....	58
Figura 13. Micrografías de microscopía electrónica de barrido ilustrando las partículas y capas del cascarón de huevo en polvo.....	59
Figura 14. Cinética de adsorción de fenoles totales remanentes en hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos, con cascarón de huevo al 6% (p/v) y ajuste de pH 3, 6, 9 y 11.....	60
Figura 15. Cinética de adsorción de azúcares reductores remanentes en hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos con cascarón de huevo en polvo al 6% (p/v) ajustado a pH 3, 6, 9 y 11.....	61
Figura 16. Comportamiento del pH debido a la presencia de cascarón de huevo en polvo en hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos	61
Figura 17. Ácido levulínico remanente de los tratamientos a pH 3, 9 y 11 a las 4 h de tiempo de contacto con y sin cascarón de huevo en polvo.....	62
Figura 18. 5-(hidroximetil)furfural remanente de los tratamientos a pH 3, 9 y 11 a las 4 h de tiempo de contacto con y sin cascarón de huevo en polvo.....	63
Figura 19. Isotherma de adsorción de compuestos fenólicos sobre cascarón de huevo en polvo (6%), pH 3, temperatura ambiente (25 °C), 300 rpm durante 24 h.....	66

Figura 20. Amplificación de fragmento de DNA de ~1459 pb de la subunidad ribosomal 16s.	69
Figura 21. Tinción Gram. bacterias productoras de H ₂ Succ..	70
Figura 22. Árbol filogenético de la bacteria aislada <i>Caprina EHC</i> los microorganismos relacionados basados en su secuencia de la subunidad ribosomal 16s.	71
Figura 23. Producción de ácido succínico. Producción de ácido succínico por bacterias aisladas.	72
Figura 24. Producción final de ácido succínico y ácidos concomitantes con a 48 h de <i>A. succinogenes</i> y bacteria aislada <i>Caprina EHC</i> . .	72
Figura 25. Cromatograma de producción de hidrógeno por parte de <i>Caprina EHC</i>	73
Figura 26. Electrofermentación en cámara catódica de <i>A. succinogenes</i> con hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos como fuente de carbono	74
Figura 27. Biomasa en cámara catódica de <i>A. succinogenes</i> con hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos como fuente de carbono en electrofermentación y fermentación convencional.	75
Figura 28. Consumo de corriente en producción de ácido succínico por <i>A. succinogenes</i> a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos mediante una celda de electrosíntesis microbiana.	75
Figura 29. Micrografía de microscopía electrónica de barrido del centro del cátodo (tela de carbono) de una celda de electrosíntesis microbiana destinada a la producción de ácido succínico a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos por un cultivo de <i>A. succinogenes</i>	76
Figura 30. Cinética de producción de ácido succínico y consumo de sustrato de <i>A. succinogenes</i> a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en celda de electrosíntesis utilizando como separador membrana de agar.	78
Figura 31. Cinética de producción de ácido succínico y consumo de sustrato de <i>A. succinogenes</i> a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en celda de electrosíntesis utilizando como separador membrana de Nafion.	78
Figura 32. Cinética de producción de ácido succínico y consumo de sustrato de <i>A. succinogenes</i> a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en la cámara catódica de celda de electrosíntesis utilizando como separador membrana de agar.	79
Figura 33. Cinética de producción de ácido succínico y consumo de sustrato de <i>A. succinogenes</i> a partir de hidrolizado de la fracción	

orgánica de residuos sólidos urbanos en la cámara catódica de celda de electrosíntesis utilizando como separador membrana de Nafion.	79
Figura 34. Cinética de producción de ácido succínico y consumo de sustrato de <i>A. succinogenes</i> a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en la cámara anódica de celda de electrosíntesis utilizando como separador membrana de agar.	80
Figura 35. Cinética de producción de ácido succínico y consumo de sustrato de <i>A. succinogenes</i> a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en la cámara anódica de celda de electrosíntesis utilizando como separador membrana de Nafion.	80
Figura 36. Tinción de Gram de bacterias presentes medio de cultivo al final de la fermentación	81
Figura 37. pH en celda de electrosíntesis microbiana con diferente separador membrana de agar vs Nafion y cultivo de <i>A. succinogenes</i> para producción de ácido succínico a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos.	81
Figura 38. Biomasa planctónica en celda de electrosíntesis microbiana con diferente separador de Nafion o de agar y cultivo de <i>A. succinogenes</i> para producción de ácido succínico a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos.	81
Figura 39. Cinética de consumo de sustrato de <i>Caprina EHC</i> a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en la celda de electrosíntesis microbiana utilizando como separador membrana Nafion.	82
Figura 40. Cinética de producción de ácidos orgánicos por <i>Caprina EHC</i> a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en la celda de electrosíntesis microbiana utilizando como separador membrana Nafion.	83
Figura 41. Masa de succínico producido mediante electrofermentación en lote.	89
Figura 42. Rendimiento de ácido succínico.	90
Figura 43. Índice de Poggi electrofermentación vs. fermentación convencional.	91
Figura 44. Relación entre ácido succínico y ácidos concomitantes.	92
Figura 45. Índice ψ	94
Figura 46. Energía eléctrica, calefacción y mezclado empleada en la electrofermentación.	94
Figura 2.1. Efecto del tratamiento alcalino con NaOH en la obtención de azúcares reductores de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos	114
Figura 5.1. Cromatograma de correspondiente los azúcares glucosa y xilosa en hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos.	119

Figura 5.2. Cromatograma correspondiente a 5-(hidroximetil)furfural.....	119
Figura 5.3. Cromatograma correspondiente a ácido levulínico.	119
Figura 5.4. Cromatograma correspondiente a ácido fórmico.	120
Figura 5.4. Cromatograma correspondiente a ácido acético.....	120
Figura 8.1. Montaje de la celda de electrofermentación microbiana para la producción de ácido succínico mediante celda de electrosíntesis microbiana (CESIM).....	129
.....	130
Figura 8.2. Consumo de corriente en producción de ácido succínico por <i>A. succinogenes</i> (T1) a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos mediante una celda de electrosíntesis microbiana utilizando una membrana de Nafion como separador y MgCO ₃ como neutralizador de pH.	130
Figura 8.3. Consumo de corriente en producción de ácido succínico por <i>A.</i> <i>succinogenes</i> (T2) a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos mediante una celda de electrosíntesis microbiana utilizando una membrana de agar como separador y MgCO ₃ como neutralizador de pH.	131
Figura 8.4. Consumo de corriente en producción de ácido succínico por <i>Caprina EHC</i> (T3) a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos mediante una celda de electrosíntesis microbiana utilizando una membrana de Nafion y MgCO ₃ como neutralizador de pH.....	132
Figura 8.5. Consumo de corriente en producción de ácido succínico por <i>A. succinogenes</i> (T4) a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos mediante una celda de electrosíntesis microbiana utilizando una membrana de Nafion y NaHCO ₃ como neutralizador de pH.....	133

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ANOVA	Análisis de varianza
AR	Azúcares reductores
A_{equip}	Superficie externa del equipo
$A_{externa}$	Área externa de la CESIM considerando el aislante
$A_{membrana}$	Área de la membrana expuesta
BES	Sistemas bioelectroquímicos
C	Coeficiente de la intensidad del mezclado
CA	Carbón activado
CCM	Celda de combustible microbiano
CESIM	Celda de electrosíntesis microbiana
C_i	Concentración inicial
CHP	Cascarón de huevo en polvo
C_{ms}	Concentración de materia seca en el medio de cultivo
C_p acrílico	Calor específico del acrílico
C_p aislante	Calor específico del aislante
C_p m.cultivo	calor específico del medio de cultivo
C_p electrolitos	Calor específico (presión constante) de los electrolitos
C_p equip	Calor específico del equipo
CRA	Capacidad de retención de agua
C_t	Concentración a cualquier tiempo
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DO_{660}	Densidad óptica a 660 nm
E	Potencial: voltaje de la fem aplicada a la CESIM
e acrílico	Espesor del acrílico
e aislante	Espesor del aislante
$E_{aplicada}$	Energía aplicada a la CESIM durante el tiempo de operación
$E_{calefacción}$	Energía térmica requerida para elevar la temperatura de los electrolitos y el equipo, así como, la pérdida de calor, en kJ
E_{electr}	Energía eléctrica utilizada en la fermentación, en kJ
$E_{mezclado}$	Energía utilizada en la agitación, en kJ
E_{total}	Energía total
FORSU	Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos
g_{CHP}	gramo de cascarón de huevo en polvo
GC-FID	Cromatógrafo de gases acoplado con detector de ionización de flama
GEI	Gases de efecto invernadero
g_{fen}	gramo de compuestos fenólicos
gl	Grados de libertad
$g_{producto}$	gramos de producto
$g_{sustrato}$	gramos de sustrato
H_2	Hidrógeno
H_2Succ	Ácido succínico
HMF	5-(hidroximetil)furfural
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
I	Intensidad de corriente en la CESIM
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía

k_1	Coefficiente de reacción del primer orden
k_2	Coefficiente de reacción del segundo orden
$K_{\text{acrílico}}$	Conductividad térmica del acrílico
K_{aislante}	Conductividad térmica del aislante
k_l	Tasa constante de isoterma lineal
k_f	Tasa constante de isoterma Freundlich
LCA	Análisis de ciclo de vida
MESynC	Microbial electrosynthesis cell
MIA	Membrana de intercambio aniónico
MIC	Membrana de intercambio catiónico
$m_{\text{ácido acético}}$	Masa de ácido acético
m_{aislante}	Masa del aislante
m_{CESIM}	Masa del acrílico (CESIM)
$m_{\text{concomitantes}}$	Masa de los compuestos concomitantes
$m_{\text{electrolitos}}$	Masa de electrolitos en la CESIM
m_{equip}	Masa del equipo
$m_{\text{fórmico}}$	Masa del ácido fórmico
m_{glucosa}	Masa de glucosa
$m_{\text{H}_2\text{Succ,gen}}$	Masa de H ₂ Succ producida, expresada en kg o mol
$m_{\text{H}_2\text{Succ,EF}}$	Masa de H ₂ Succ producido en la CESIM, en kg o mol
$m_{\text{H}_2\text{Succ,fc}}$	Masa de H ₂ Succ producido en la fermentación convencional kg o mol
m_{iS}	Masa inicial del sustrato en kg o mol
$m_{m.cultivo}$	Masa del medio de cultivo
m_{uS}	Masa de sustrato consumido en kg o mol
m_{xilosa}	Masa de xilosa
n	Parámetro de intensidad de Freundlich
NF-117	Membrana de intercambio protónico Nafion
OFMSW	Organic fraction of municipal solid waste
P	Potencia suministrada a la CESIM
PAD	Pretratamiento con ácido diluido
PBS	Buffer fosfato salino
PESW	Powdered eggshell waste
POR	Potencial redox
q	Transferencia de calor a través del tiempo de operación
q_e	Cantidad de adsorbato adsorbido por unidad de peso de adsorbente en equilibrio a un determinado tiempo
q_{Exp}	q_e experimental
q_{Pred}	q_e predicha por un modelo
\dot{q}	Flujo de calor total (W)
q_i	Calor añadido como calefacción
q_t	Cantidad de adsorbato adsorbido por unidad de peso de adsorbente a cualquier tiempo
q_{total}	Energía de calefacción total
R^2	Coefficiente de determinación
$R_{EL/S}$	Relación másica entre el extracto de levadura y el sustrato
R_{int}	Resistencia interna
SEM	Microscopia electrónica de barrido

T_{amb}	Temperatura ambiente en °C o K
T_{oper}	Temperatura de operación, en °C o K
t_{oper}	Tiempo de operación, en minutos
U	Valor de coeficiente global de transferencia de calor
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Volumen en el dispositivo que está siendo mezclado
X_i	Factores (X_1 , concentración de H_2SO_4 (v/v); X_2 , Tiempo de hidrólisis (min))
Y_{ij}	Variable de respuesta (e.g. concentración de azúcares reductores ($g L^{-1}$))

Letras griegas

$\widehat{\beta}_j$	Coefficientes en modelos estadísticos
Δt	Periodo de operación
η_{EF}	Índice masa-energía de la electrofermentación
η_{fc}	Índice masa-energía de la fermentación convencional
$\eta_{EF/fc}$	Índice Poggi-Varaldo que relaciona η_{EF} y η_{fc}
λ	razón de carga (adsorbente/adsorbato)
μ'	Viscosidad del medio de cultivo
π	Potencia volumétrica de mezclado para fermentadores/reactores
$\rho_{m.cultivo}$	Densidad del medio de cultivo
ρ_{rel}	Densidad relativa del medio del cultivo
ψ	Índice de membrana
ω	Masa de H ₂ Succ producida/suma de masa de productos concomitantes producidos

RESUMEN

El ácido succínico (H_2Succ) es precursor de una amplia gama de productos de valor agregado con aplicaciones en las industrias química, farmacéutica, alimenticia, entre otras. Las celdas de electrosíntesis microbianas (CESIM) constituyen una nueva tecnología para la producción de compuestos de valor agregado como el H_2Succ , ácido láctico, &c. donde sus componentes principales son biocatalizadores, fuente de energía eléctrica y una fuente de carbono, como los residuos lignocelulósicos. En el presente trabajo, se obtuvo un hidrolizado de FORSU con 28.3 g L^{-1} de azúcares reductores tratando con 4% de H_2SO_4 durante 17 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$. Se evaluó el cascarón de huevo en polvo (CHP) como adsorbente de compuestos inhibidores en el hidrolizado de FORSU, demostrando que es capaz de remover compuestos fenólicos a pH ácidos, así como ácidos orgánicos y 5-(hidroximetil)furfural a pHs alcalinos. Aunque la remoción fue de baja a moderada. Respecto a isotermas de adsorción del sistema fenoles-CHP a pH 3, el modelo lineal ajustó ligeramente mejor que el modelo de Freundlich. El exponente Freundlich n resultó n menor que 1, lo que se ha asociado a una adsorción menos favorable. Esto puede ser congruente con las remociones pobres de fenol obtenidas con CHP.

Se aisló de rumen de caprino, una bacteria productora de H_2Succ y se denominó *Caprina EHC*. La secuencia del gen del rRNA16s mostró una similitud del 99.93% con *Escherichia coli* de acuerdo con la base de datos del GenBank del NCBI. Se inoculó una CESIM con *Caprina EHC* resultando en 223% de incremento en la producción final de H_2Succ con respecto a una fermentación convencional.

La producción final de H_2Succ se logró incrementar en un 113% en una CESIM utilizando una membrana de agar, inoculada con *A. succinogenes* vs. una fermentación convencional. Se encontró una mayor colonización de *A. succinogenes* en el cátodo al que se le suministro energía eléctrica. El $MgCO_3$ tuvo un efecto positivo incrementando la producción de H_2Succ . El índice $\eta_{EF/FC}$ (que compara la electrofermentación vs. la fermentación convencional en términos de masa y energía) fue 1.5 veces para la CESIM inoculada con *A. succinogenes* (equipada con membrana de agar y adición de $MgCO_3$). El consumo de energía en MESynC fue sorprendente: las pérdidas térmicas al ambiente representaron 98.6% mientras que la energía

eléctrica consumida fue despreciable (0.2%); la energía consumida por mezclado fue tan sólo 1.1%.

En la CESIM, *A. succinogenes* produjo mayor cantidad de H₂Succ que la cepa *Caprina EHC* en todos los casos. Sin embargo, la producción de H₂Succ por *Caprina EHC* en una CESIM se duplicó respecto a la fermentación convencional.

ABSTRACT

Succinic acid (H_2Succ) is a precursor of several value-added compounds that have application in the chemical, pharmaceutical, food, industries among others. Microbial electrosynthesis cells (MESynC) constitute a new technology to produce value-added compounds such as H_2Succ , lactic acid, etc. The main components of a MESynC are biocatalysts, electrical power source and carbon sources which could be a lignocellulosic residue. In the present work, hydrolysate of the organic fraction of municipal solid wastes (OFMSW) with 28.3 g L^{-1} of reducing sugars was obtained treating with 4% of H_2SO_4 by 17 min at $121\text{ }^\circ\text{C}$.

Powdered eggshell waste (PESW) was evaluated as an adsorbent of inhibitor compounds in the hydrolysate OFMSW, PEWS removed phenolic compounds at acid pH and organic acids, as well as 5-(hydroxymethyl)furfural at alkaline pHs. Although the phenolic compounds removal was low to moderate. Regarding the phenol-PESW adsorption isotherm, it was found that the linear model fitted slightly better than Freundlich model. Freundlich constant n was lower than 1 that in some international works was associated to a less favorable adsorption. This can be consistent with poor phenol removal obtained with PESW.

A bacterium producing H_2Succ from caprine rumen was isolated. It was designated as *Caprina EHC*. The analysis of the 16s rRNA gene sequence at GenBank showed 99.93% similarity to *Escherichia coli*.

A MESynC was inoculated with *Caprina EHC* showed that H_2Succ production improved by 223% compared to conventional fermentation.

Further, it was possible to increase the H_2Succ production in a MESynC seeded with *Actinobacillus succinogenes* by 113% using an agar membrane, compared to the conventional fermentation. It was found that *A. succinogenes* colonized in higher proportion a poised cathode than a non-electrical cathode (control). Addition of $MgCO_3$ to the catholyte enhanced H_2Succ production.

The profile of energy consumed by MESynC was surprising: heat loss of the cell represented 98.6% whereas the electrical energy was negligible (0.2%); the energy spent in mixing was just 1.1% of the total.

The $\eta_{EF/FC}$ index (that compares electrofermentation vs. conventional fermentation in terms of both H₂Succ production and energy consumption) was 1.5 for the MESynC seeded with *A. succinogenes* (equipped with agar membrane and MgCO₃ addition). In MESynC, *A. succinogenes* produced more H₂Succ than *Caprina EHC* in all cases. However, H₂Succ production by *Caprina EHC* in MESynC was two-fold of that in conventional fermentation.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El uso de microorganismos en la industria ha sido impulsado por el interés actual por disminuir la contaminación ambiental que ocasiona el procesamiento de compuestos químicos derivados del petróleo (Zeikus *et al.*, 1999).

1.1. Ácido succínico

El ácido succínico (H_2Succ) o ácido butanodioco es de gran interés para diferentes industrias debido a que es precursor de una amplia gama de productos químicos. El ácido succínico es conocido como un “bloque de construcción”, debido a que sus carboxilos terminales facilitan la síntesis de resinas, polímeros (succinato de polibutileno), herbicidas, fungicidas, tintas, detergentes, además, es útil en la industria alimenticia y farmacéutica (Corona-González *et al.*, 2008; Beauprez *et al.*, 2010; Brink & Nicol, 2014).

El H_2Succ tiene un precio en el mercado de U.S. \$ 5.90-9.0 por kg dependiendo de su pureza. Hasta hace pocos años, su demanda actual se encontraba en 30,000-50,000 toneladas por año (Natrass *et al.*, 2013; Jansen *et al.*, 2014). La producción mundial de H_2Succ se ha incrementado desde 15 000 toneladas por año en 1999 hasta 35 000 toneladas por año de H_2Succ para finales del año 2011 (Pinazo *et al.*, 2015). Un crecimiento promedio de 11% por año.

La mayor parte del H_2Succ comercialmente disponible es sintetizado por la industria petroquímica (Zeikus *et al.*, 1999; Song & Lee, 2006), por una hidrogenación catalítica del anhídrido maleico a anhídrido succínico; también se produce por una hidrogenación catalítica directa del ácido maleico (Sheng *et al.*, 2016). En la última década se ha incrementado su producción mediante fermentación de sustratos renovables debido aspectos económicos y ambientales (Urbance *et al.*, 2004).

El H_2Succ proveniente de un proceso fermentativo convencional tiene un costo de producción de U.S. \$1.66 a 2.2 por kg, por lo que aún no es económicamente competitivo si se compara con el H_2Succ de origen petroquímico (costo de producción U.S. \$1.05 a 1.29 por kg), el mayor reto se debe a la dificultad del proceso de separación (Fu *et al.*, 2014). Sin embargo, hoy en día existen compañías como

BioAmber, Reverdia, BASF y DSM, las cuales producen H₂Succ por fermentación convencional (van Heerden & Nicol, 2013; Carvalho *et al.*, 2014a).

Durante la producción de una tonelada de H₂Succ mediante la industria petroquímica se generan 7.1 toneladas de gases de efecto invernadero (GEI). Un estudio independiente de Análisis de Ciclo de Vida (LCA, por sus siglas en inglés *Life Cycle Analysis*) realizado a la compañía BioAmber indicó que en la fermentación convencional la emisión de GEI es cero; El LCA también reveló una reducción del 60% en el uso de energía, y aunque actualmente en su proceso utiliza maíz para la producción de H₂Succ, se pretende aprovechar residuos forestales e industriales (© Bioamber inc, 2016).

El H₂Succ es un metabolito ubicuo en procariontes y eucariontes. Dependiendo del pH de la solución, se encuentra en su forma no ionizada o molecular es el ácido succínico (H₂Succ) o en su forma ionizada como bisuccinato (HSucc⁻) y succinato (Succ²⁻). En la Tabla 1 se enlistan las propiedades del H₂Succ (Hepburn, 2011).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del ácido succínico

Propiedad	Valor
Fórmula molecular	(CH ₂ COOH) ₂
Peso molecular (g mol ⁻¹)	118.09
Punto de ebullición (°C)	235
Punto de fusión (°C)	188
Solubilidad en agua (g L ⁻¹) a 25 °C	76.90
pK _{a1}	4.21
pK _{a2}	5.64

El H₂Succ es producido como un intermediario en la ruta de los ácidos tricarbónicos y es un producto de fermentación (Zeikus *et al.*, 1999). Es producido por varios microorganismos como *Actinobacillus succinogenes*, *Apergillus niger*, *A. fumigatus*, *Byssochlamys nivea*, *Lentinus degener*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium viniferum* y *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente modificada (Song & Lee, 2006; Sosa *et al.*, 2016). *A. succinogenes* se destaca por asimilar un amplio rango de fuentes de carbono pentosas y hexosas y algunos disacáridos (sacarosa & celobiosa) y

presentar tolerancia a compuestos inhibidores (Jiang *et al.*, 2013; Pateraki *et al.*, 2016). En la Tabla 2 se muestran los principales productores de H₂Succ y algunos parámetros como producción, rendimiento, fuente de carbono, entre otros.

Una gran cantidad de bacterias productoras de H₂Succ han sido aisladas del rumen. El H₂Succ es un precursor del propionato, este último es absorbido a través de la pared del rumen y es aprovechado como fuente de carbono y energía por el rumiante (Zeikus *et al.*, 1999). Existen diferentes microorganismos ruminales productores de H₂Succ, entre ellos se encuentran *A. succinogenes*, *Bacteroides amylophilus*, *Basfia succiniciproducens*, *Cytophaga succinicans*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Succinimonas amylolytica*, *Succinivibrio dextrinisolvens* y *Wolinella succinogenes* (Bryan & Small, 1956; Bryan *et al.*, 1958; Scheifinger y Wolin, 1973; Davis *et al.*, 1976; Van der Werf *et al.*, 1997; Guettler *et al.*, 1999; Zeikus *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2002). Es importante mencionar que la única cepa MBEL55E de *M. succiniciproducens* es una cepa patentada y comercialmente no disponible (Kuhnert *et al.*, 2010).

A. succinogenes 130Z es una bacteria Gram negativa, ruminal, osmotolerante, anaerobia facultativa y está ubicado en la siguiente categoría taxonómica:

Dominio: Bacteria
 Reino: Eubacteria
 Filo: Proteobacteria
 Clase: Gammaproteobacteria
 Orden: Pasteurellales
 Familia: Pasteurellaceae
 Género: *Actinobacillus*
 Especie: *succinogenes*

A. succinogenes utiliza una amplia fuente de azúcares como fuente de carbono, tales como L-arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa, sucrosa, D-xilosa y salicina (Guettler *et al.*, 1999). *A. succinogenes* es capaz de degradar diferentes sustratos complejos como azúcar de caña, glicerol, e hidrolizados de diferentes fuentes, *i.e.* de olote, rastrojo de maíz y de arroz, paja y harinas de vainas de algarrobo (Liu *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2010; Binns *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2014a; Carvalho *et al.*, 2014b; Zhao *et al.*, 2016).

Además, está documentado que la ruta metabólica fosfoenolpiruvato carboxiquinasa es la única responsable de la producción de H₂Succ en *A. succinogenes* (Liu *et al.*, 2008; Zeikus *et al.*, 1999); En la ruta mencionada se fija un mol de CO₂ por mol de H₂Succ producido.

Se ha reportado que *A. succinogenes* produce 66.4 g L⁻¹ de H₂Succ por cada 98.3 g L⁻¹ de glucosa que consume después de 84 h de fermentación en lote (Guettler *et al.*, 1996). Una limitante en el crecimiento, consumo de glucosa y producción de H₂Succ en el cultivo de *A. succinogenes* es la falta en el medio de la vitamina biotina, ya que la adición al medio de cultivo de la vitamina incrementa hasta en un 49% la producción de H₂Succ (Chen *et al.*, 2011).

En teoría, para producir 1 mol de H₂Succ se requiere 0.5 mol de glucosa o 0.6 mol de xilosa, y 2 mol de NADH para reducir el oxalacetato a fumarato y luego a H₂Succ, además de fijar 1 mol de CO₂ (Yazdani & González, 2007; Pateraki *et al.*, 2016). Es decir, cuando a un cultivo de *A. succinogenes* se le suministra xilosa como fuente de carbono, se requiere de un 20% más de sustrato con respecto a si la fuente de carbono fuera glucosa para producir la misma cantidad de H₂Succ, por lo tanto, es requerido incrementar el poder reductor adicional (*i.e.* NADH). Las relaciones estequiométricas se muestran en la Fig. 1.

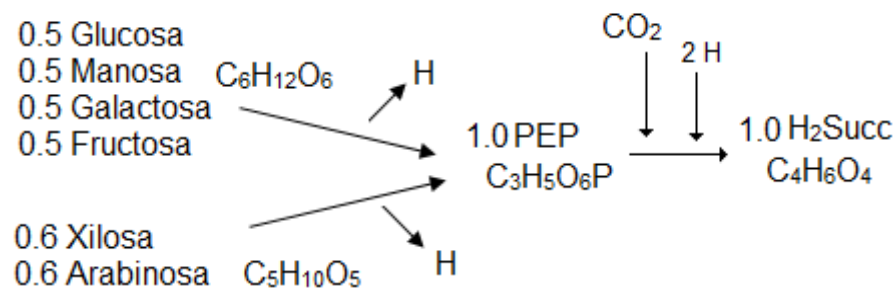


Figura 1. Relación estequiométrica de la fermentación de hexosas y pentosas para la producción de ácido succínico. H: equivalentes reductores (H: NADH/NADPH/FADH₂); PEP: fosfoenolpiruvato.

Tabla 2. Producción de ácido succínico por diferentes microorganismos

Microorganismo	Tipo de proceso	Concentración final celular (g biomasa L ⁻¹)	Tiempo (h)	Concentración final de H ₂ Succ (g L ⁻¹)	Pseudorendimiento (g _{H₂Succ} /g _{sustrato} alimentado)	Productividad (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Producción de concomitantes H ₂ Succ:AO (g:g)	Ref.
<i>A. succinogenes</i> Cepa 130Z	Lote	-	84	66.4	0.67	0.79	Ácido acético, fórmico, propiónico, 2.4:1	[1]
<i>M. succiniciproducens</i> Cepa LPK7 ^b	Lote	1.75	21	15.4	0.86	0.73	Ácido pirúvico 3.1:1	[2]
<i>Corynebacterium glutamicum</i> Cepa (Δ ldhApCRA717)	Lote	40-60	46	-	0.92	3.2	Ácido acético 9.2:1	[3]
<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i> ^b	Lote con recirculación de X	3.6	26	14.3	0.72	3.3	Ácido acético 4.1:1	[4]
<i>Ibidem</i> Cepa ATCC 53488	Continuo	42	D=0.93 h ⁻¹	83	0.89	14.8	Ácido acético 4.5:1	[5]
<i>Escherichia coli</i> recombinante Cepa HL27659k(pKK313)	Lote alimentado	35 ^a	59	58.3	0.56	1.08	Ácido acético 19.4:1	[6]

^a La concentración celular fue representada como densidad óptica al medir la absorbancia, ^b Bacterias anaerobias obligadas. AO: ácidos orgánicos. Referencias [1] Guettler *et al.*, 1996, [2] Shen *et al.*, 2014. [3] Oh *et al.*, 2009, [4] Okino *et al.*, 2008, [5] Meynial-Salles *et al.*, 2008, [6] Lee *et al.*, 2008.

1.2. Sistemas bioelectroquímicos

Los sistemas bioelectroquímicos (BES, por sus siglas en inglés) constituyen una nueva tecnología, que combina biotecnología con electroquímica. Depende de la acción de biocatalizadores en el ánodo, cátodo o ambos. Primeramente, distinguimos entre dos grandes categorías de BES, aquellos que utilizan enzimas como biocatalizador y los que utilizan microorganismos (Hamelers *et al.*, 2009 & 2010).

También podemos clasificar los BES en dos tipos: celda de combustible microbiana (CCM) y celdas de electrosíntesis microbiana (CESIM), el primer tipo de dispositivo produce energía eléctrica a partir de fuentes de carbono, mientras que el segundo se necesita un constante suministro de energía eléctrica (Fig. 2; Hernández-Correa *et al.*, 2017a).

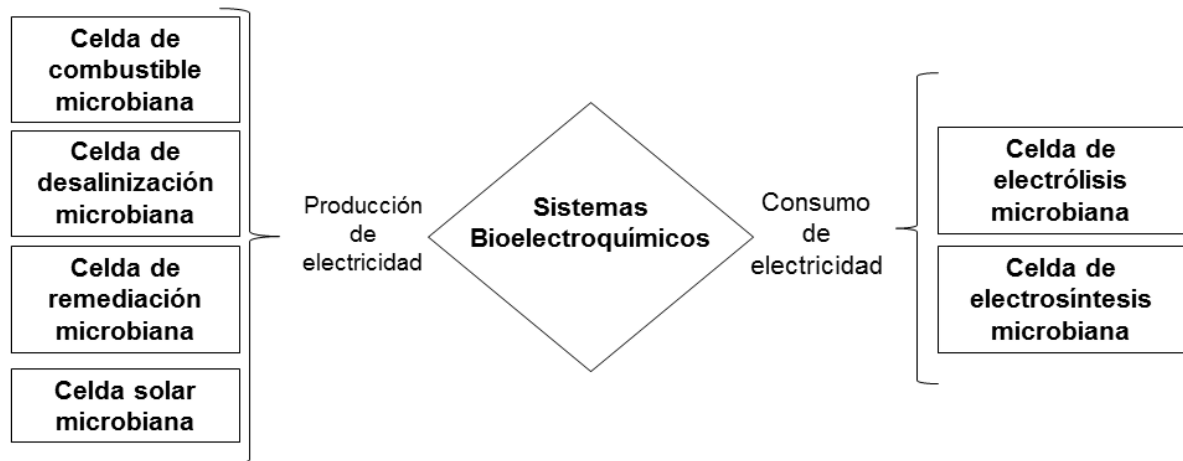


Figura 2. Tipos de sistemas bioelectroquímicos
1.2.1. Celdas de combustible microbiana

Las CCMs son capaces de producir electricidad a partir de la oxidación de compuestos orgánicos, usualmente biomasa residual (i.g. agua residual o efluentes; Logan *et al.*, 2006; Chaudhuri & Lovley, 2003).

Existen varios subtipos de CCM, como las celdas microbianas de desalinización (Cao *et al.*, 2009) o las celdas microbianas para la remediación (Blanco-Mendoza *et al.*, 2017, Camacho-Pérez *et al.*, 2013). Las primeras tienen el propósito de remover sal a partir de efluentes, mientras que, las segundas se enfocan en la remediación de suelos y sedimentos contaminados, ambos dispositivos pueden generar energía eléctrica. Las celdas microbianas solares constituyen un subtipo de CCM, en este

dispositivo se oxida biomasa fotosintética con la finalidad de producir electricidad (Strik *et al.*, 2011).

1.2.2. Celdas de electrosíntesis microbiana

Las CESIM son una tecnología emergente, la cual no produce electricidad, al contrario, requiere de una fuente de energía eléctrica. Este tipo de dispositivo como se mencionó anteriormente tiene entre sus componentes biocatalizadores, los cuales aprovechan fuentes de carbono como CO_2 , azúcares (que podrían provenir de residuos), etc. los cuales pasan por un proceso de óxido-reducción para producir compuestos de valor agregado. Esta conversión es ayudada parcial o completamente por energía eléctrica (Fig. 3; Rabaey & Rozendal, 2010; May *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016).

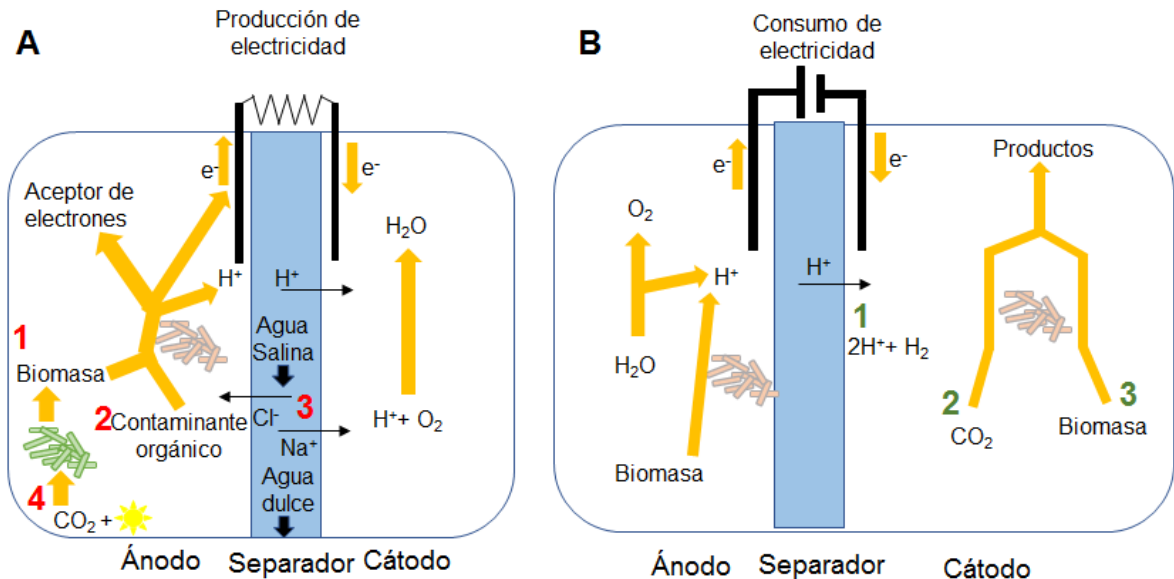


Figura 3. Sistemas bioelectroquímicos (A) con producción de electricidad. Los números rojos dentro de la cámara anódica de la figura indican los tipos de sistemas bioelectroquímicos. 1, celda de combustible microbiana; 2, celda de remediación microbiana; 3, celda de desalinización microbiana; 4, celda solar microbiana (B) Sistemas bioelectroquímicos que consumen electricidad. Los números verdes dentro de la cámara catódica de la figura indican los tipos de sistemas bioelectroquímicos. 1, celda de electrólisis microbiana; 2, celda de electrosíntesis microbiana con producción de compuestos de valor agregado a partir de carbono inorgánico; 3, celda de electrosíntesis microbiana con producción de compuestos de valor agregado a partir de carbono orgánico.

En los últimos años la atención recibida por las CESIMs se ha incrementado como una alternativa a la síntesis de compuestos químicos incluidos aquellos que se

producen por fermentación convencional, debido a las ventajas potenciales de esta tecnología. Las ventajas reconocidas son (i) almacenar la energía eléctrica en un producto, (ii) producción de combustibles o compuestos “bloque de construcción” utilizando residuos para reemplazar aquellos productos de origen petroquímico, (iii) modificar el flujo metabólico hacia un producto final en la fermentación al incrementar el estado redox en los microorganismos (Harrington *et al.*, 2015; Butler & Lovley, 2016; Hernández-Correa *et al.*, 2017a). El estado redox se incrementa aumentando la cantidad de cofactores como NADH o NADPH disponibles para el microorganismo. Se ha demostrado que es una estrategia efectiva para incrementar la producción de un producto como el H₂Succ (Berríos-Rivera *et al.*, 2002).

La CESIM se encuentra comúnmente dividida en dos cámaras, la anódica y la catódica, separados por una membrana semipermeable. Comúnmente se utiliza una membrana de intercambio catiónico (Gildemyn *et al.*, 2015). Una desventaja de la membrana catiónica estándar de Nafion es su alto costo. Por ejemplo, se ha reportado que tiene un costo de U.S. \$1733 por m² (Hernández-Flores *et al.*, 2015). Es necesario buscar alternativas en materiales de bajo costo con el objetivo de poder escalar y hacer comercialmente viable este proceso.

La cámara catódica típicamente se encuentra colonizada por un biocatalizador, y es donde la síntesis de compuestos de valor agregado o de compuestos masivos (commodities) se lleva a cabo. El microorganismo es capaz de tomar los electrones del cátodo, ya sea de manera directa o indirecta, y utilizar este poder reductor para la producción tanto de compuestos masivos, como de compuestos de valor agregado (Hernández-Correa *et al.*, 2017).

En el grupo de trabajo distinguimos al menos dos diferencias entre productos de valor agregado y compuestos masivos. La primera es el precio por unidad de masa y la segunda es la escala mundial de producción/consumo. Los productos de valor agregado son compuestos químicos con un alto precio de venta y una baja a moderada escala producción/consumo, mientras que los compuestos masivos son químicos y combustibles con un bajo a moderado precio de venta y una gran masa de producción/consumo. Un precio límite podría establecerse en U.S. \$ 1000 por tonelada métrica, sí el precio del químico es por debajo de este valor, el producto es un

compuesto masivo, mientras que sí se encuentra por arriba de este valor podría ser considerado un producto de valor agregado.

Hasta ahora, una amplia diversidad de productos de valor agregado y compuestos masivos han sido producidos en CESIM, por ejemplo, hidrógeno, sosa caustica, peróxido de hidrógeno, metano, ácidos orgánicos y alcoholes (Rozendal *et al.*, 2006; Lalaurette *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2014; May *et al.*, 2016). El H₂ ha sido producido en dispositivos bioelectroquímicos con un cátodo abiótico. Choi *et al.* (2014) obtuvieron butanol a partir de glucosa, así como 1,3-propanediol a partir de glicerol empleando como biocatalizador en el cátodo a *Clostridium pasteurianum* DSM 525 (Tabla 3).

Gildemyn *et al.* (2015) obtuvieron ácido acético en una CESIM con configuración de tres cámaras. Este dispositivo permite la extracción y concentración del producto, superando de 2 a 3 veces la concentración de ácido acético obtenida por una fermentación convencional. Para profundizar en la síntesis de ácido acético en CESIM, se recomienda consultar May *et al.* (2016).

Con respecto a la producción de H₂Succ, *A. succinogenes* y otros microorganismos son capaces de incrementar su estado redox aprovechando los electrones mediante un proceso de transferencia de electrones del cátodo hacia el microorganismo utilizando un acarreador como el rojo neutro (Tabla 4). La transferencia de electrones entre ambas cámaras va correlacionada por una transferencia equivalente de iones, lo cual ocurre a través del separador, por lo tanto, la electroneutralidad es preservada (Logan & Regan, 2006).

El rojo neutro (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride) es un colorante catiónico que es comúnmente usado para ensayos de toxicidad debido a su característica de virar de rojo a amarillo al rango de pH fisiológico 6.8-8.0 (Halliday & Matthews, 1983). Propiedades del rojo neutro (Qiu *et al.*, 2009; McKinlay & Zeikus, 2004).

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del rojo neutro

Propiedad	Valor
Fórmula molecular	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄
Peso molecular	288.8
Punto de ebullición (°C)	497.3
Punto de fusión (°C)	290
Solubilidad en agua (g L ⁻¹)	50
pK _a	6.8
Rango pH (rojo a amarillo)	6.8-8.0
Potencial de reducción estándar (mV _{Ag/AgCl})	-525

Park *et al.* (1999) demostraron que *A. succinogenes* es capaz de producir H₂Succ a partir de fumarato en un biorreactor electroquímico utilizando rojo neutro como acarreador de electrones, el cual no inhibe el crecimiento de la bacteria; Además, reportaron un rendimiento de 0.9 g de H₂Succ/g de glucosa consumido, en un proceso de 25 h a un potencial fijo de 2.0 V y una intensidad de entre 1.5 a 10 mA.

Zhao *et al.* (2016) incrementaron 1.33 veces (33%) la producción de H₂Succ por *A. succinogenes* mediante la fermentación de hidrolizado de olote en una CESIM utilizando NF-117 como membrana de intercambio protónico (MIP) y NaOH como regulador de pH, obtuvieron una concentración de 18.09 g L⁻¹ durante un proceso de 60 h a un potencial fijo de -1.8 V, así como un rendimiento de 0.6 g de H₂Succ/g de sustrato alimentado (Tabla 4).

Tabla 4. Producción de compuestos de valor agregado y commodities selectos.

Microorganismo/sustrato/ (conc. inicial g L ⁻¹)	Producto/ Concentración (g L ⁻¹) ^a / Rendimiento (g _{producto} /g _{sustrato})/ Electroferment vs ferment convencional (%)	Operación del reactor/ POR ^e / Fuente de energía/ Mecanismo transfer de electrones	Tipo de reactor/núm. de cámaras/ escala: volumen de trabajo (L)/mezclado /temperatura (°C/calefacción /pH /Separador/Material del Cátodo	Integración a bio- refinería/análisis de sistema/ balance (energía y biomasa/ escalamiento	Ref .
<i>Corynebacterium glutamicum</i> / glucosa (20)	lactato/15.5/0.76/120.9	Lote (24 h) - 0.6/Potenciostato/in directa/ AQDS ^c	Tipo H /Dual/0.25/agitador magnético 330 rpm/30 °C/sin control de pH /Nafion 118 PEM/lamina de grafito C-prorosa lamina de grafito A	no/no/no/no	[1]
<i>Actinobacillus succinogenes</i> /hidrolizado de olote(15)	Succinato/3.84/0.26/130.6	Lote (24 h) - 1.8/Fuente de poder/ indirecta/Rojo neutro ^c	NM/Dual/0.28/11.5/37/incubada/pH inicial 7.2/Nafion 117 /fieltro de carbono	no/no/incompleta/no	[2]
<i>A. succinogenes</i> / glucosa (15)	Succinato/7.88/0.53/134.9	Lote (24 h) - 1.8/Fuente de poder/ indirecta-rojo neutro ^c	NM/Dual/0.28/11.5/37/incubada/pH inicial 7.2/Nafion 117 /fieltro de carbono	no/no/si incompleta/no	[2]
<i>A. succinogenes</i> / xilosa (15)	Succinato/5.24/0.35/151.88	Lote (24 h) - 1.8/Fuente de poder/ indirecta-rojo neutro ^c	NM/Dual/0.28/11.5/37/incubada/pH inicial 7.2/Nafion 117 /fieltro de carbono	no/no/si incompleta	[2]

<i>A. succinogenes/</i> arabinosa (15)	Succinato/4.7/0.31/209.82	Lote (24 h)/ - 1.8/Fuente de poder/ indirecta-rojo neutro ^c	NM/Dual/0.28/11.5/37/incubada/pH inicial 7.2/Nafion 117 /fieltro de carbono	no/no/no/no	[2]
Cultivo mixto dominado por especies del género <i>Clostridium/</i> <i>/CO₂</i>	(^a butirato-acetato-etanol- butanol)/ (1.78-2.84-1.42- 0.54)/ NR/ Control no reportado	Lote (34 d)/ - 0.8/NM/ compuesto donador-H ₂ ^b	Tipo H/ /Dual/0.12/agitado/33.9/envuelto con una bobina de tubo de plástico conectado un baño termostático/ pH inicial 6.5/ CMI 7000 CEM/ tela de carbono/barra de titanio	no/no/no/no	[3]
acetato-inoculo reductor/ acetato (3)	(^a etanol-metano- propionato-butirato)/ (0.08- 0.06-0.04-0.044)/ 0.075/ control no reportado	Lote (10 d)/ - 0.55/Fuente de poder/ Compuesto donador-H ₂ ^b	Cara plana /Dual/0.87/100rpm/30/regulado a pH 6 con controlador/ monovalente selective AEM/ fieltro de grafito	no/no/si incompleta/no	[4]
<i>Escherichia coli/</i> glucosa (20)	(lactato/Formato/etanol/acet ato/succinato)/ (3.72-1.06- 0.86-1.08-0.35)/ 1.06/(115.43-101.95- 115.42-120.58-125.42)	Lote (15.5 h)/ -0.65/ potenciostato custom-built / indirecta/rojo neutro ^c	Tipo Adams and Chittenden /Dual/0.1/barra magnética 150rpm/37/incubada/pH inicial 6/ CMI 7000 CEM fieltro de grafito/barra de grafito	no/no/si incompleta/no	[5]
<i>Klebsiella pneumoniae/</i> glicerol (20)	(Propanediol-etanol- acetato-lactato-succinato)/ (5.88-1.29-1.17-0.51-0.18)/ 0.74/	Lote (15.5 h)/ -0.65/ indirecta/rojo neutro ^c	Tipo Adams and Chittenden /Dual/0.1/barra magnética 150rpm/37/incubada/pH inicial 6/ CMI 7000 CEM fieltro de grafito/barra de grafito	no/no/si incompleta/no	[5]

<i>Zymomonas mobilis</i> / glucosa (20)	(Etanol-acetato-succinato)/ (23.45-1.95-0.92) /0.55/(97.5-120.28-102.1)	Lote (21.5 h)/ -0.65/ indirecta/rojo neutro ^c	Tipo Adams and Chittenden /Dual/0.1/barra magnética 150rpm/37/incubada/pH inicial 6/ CMI 7000 CEM fieltro de grafito/barra de grafito	no/no/si incompleta/no	[5]
<i>A. succinogenes</i> / glucosa (10.8)	(^a succinato-etanol-formato- acetato)/ (9.79-0.97-0.41- 0.23) /0.91/(161.7-405- 24.35-58.6)	Lote (24 h)/ -2/ indirecta/rojo neutro ^c	NM/Dual/0.3/37/pH inicial 7/ Nafion PEM/fieltro de grafito	no/no/si incompleta/no	[6]
<i>Clostridium pasteurianum</i> DSM 525/ glucosa (18)	(^a butanol-butirato-acetato) (*1-3.8-2) /0.38/(250-84.3- 86.9)	Lote (40)/ -0.16/ Directa/cátodo ^d	Tipo H/Dual/0.3/nm/37±1/tapas de calefacción/pH inicial 6.5/ Nafion 117 PEM/(fieltro de grafito-lamina de platino)	no/no/si incompleta/no	[7]
<i>C. pasteurianum</i> DSM 525/ glicerol (27.6)	(^a 1,3-propandiol- butanol/butirato/etanol)/(7.1 4-4.35-1.1-0.57)/156.2- 60.75-106.8-84.1)	Lote (50)/ -0.16/ Directa/cátodo ^d	Tipo H/Dual/0.3/nm/37±1 /tapas de calefacción /pH inicial 6.5/ Nafion 117 PEM/(fieltro de grafito-lamina de platino)	no/no/si incompleta/no	[7]
Comunidad productora de acetato, dominado por <i>Clostridiales</i> /CO ₂	1 ^{er} ciclo: Acetato/compartimiento catódico (1.8), compartimiento de extracción (11.9), anolito (7); 2 ^{do} ciclo: Acetato/cátodo (2.3), compartimiento de extracción (13.5), anolito (8.5)	Lote (1 ^{er} ciclo día 10 A 43; 2 ^{do} ciclo día 54 a 86) con recirculación (0.031L)/ -1.140/ Directa/cátodo ^d	Tres compartimientos 0.2/21/regularado a pH 8.4/AEM & CEM/fieltro de carbono /malla recubierta con titanio TiO ₂ /IrO ₂ (35/65 %)	no/no/no/no	[8]

<i>Cellulomonas uda- Geobacter sulfurreducens</i> /Celobiosa (5)	Etanol & H ₂ /1.23/0.28/269	Lote (3 días) /0.24/Potenciostato VPS/directa/	Cámara sencilla/unicameral/1/agitador magnético/30/pH inicial/6.97/sin separador/carbono vítreo reticulado/filtro de grafito	No/No/No/Si	[9]
Cultivo homoacetogenico dominado <i>Megasphaera sueciensis</i> / CO ₂ limitado	Butirato/22.2/control no reportado	Lote (22 días)/0.8/Potenciostato/directa	BES tubular/Dual/1.3/recirculación/38/Bufers: tanques externos/membrana de intercambio catiónico/Tela de carbono/Ti-MMO	no/no/si incompleta/no	[10]

Notas: Compuesto donador de electrones ^aproducto objetivo/rendimiento ($G_{\text{producto}}/G_{\text{sustrato}}$); Mecanismo de transferencia de electrones: ^b e⁻ compuesto donador, ^c mediador o ^d cátodo. Potencial Redox. Referencias: [1]. Sasaki *et al.*, 2014; [2]. Zhao *et al.*, 2016; [3]. Ganigué *et al.*, 2015; [4]. Steinbusch *et al.*, 2010; [5]. Harrington *et al.* 2015; [6]. Park *et al.*, 1999; [7]. Choi *et al.*, 2014; [8]. Gildemyn *et al.*, 2015; [9]. Awate *et al.*, 2017, [10]. Battle-Vilanova *et al.*, 2017.

1.3. Separación de ácido succínico del medio de cultivo

Una vez que se produce el H₂Succ por fermentación, este requiere de un proceso de purificación, el cual es esencial para removerlo del caldo de fermentación. Sin embargo, los procesos de purificación del H₂Succ generalmente representan del 50-80% del costo de producción (Inci, 2007). Las barreras a superar en la recuperación del H₂Succ son: la baja concentración en el caldo de cultivo, la presencia de productos concomitantes como otros ácidos carboxílicos (ácido acético y fórmico). El mantenimiento del pH cercano a neutro durante la fermentación ocasiona que en el caldo de fermentación final los ácidos carboxílicos se encuentren como carboxilatos en lugar de su forma no ionizada (Orjuela *et al.*, 2011). Además representa complejidad y costo porque se está añadiendo constantemente una solución alcalina al medio de cultivo para mantenerlo a un pH cercano a neutro.

Se han propuesto varias operaciones unitarias para la recuperación del H₂Succ del caldo de fermentación, por ejemplo, la precipitación selectiva con amoníaco o hidróxido de calcio, la separación con membrana por ultrafiltración, nanofiltración, electrodiálisis, adsorción con una resina de intercambio iónico o alúmina, extracción con solventes o aminas, cristalización directa y métodos de esterificación (Sosa *et al.*, 2016; Sheng *et al.*, 2016). Cabe resaltar que la mayoría de los trabajos publicados en purificación de H₂Succ trabajan con soluciones artificiales de H₂Succ, la cual no representa fielmente un caldo de fermentación.

Es importante mencionar que una característica del H₂Succ, es que dos o más moléculas pueden estar unidas por puentes de hidrógeno intermoleculares, lo cual incrementa el tamaño de las moléculas (Sheng *et al.*, 2016).

Gildemyn *et al.* (2015) proponen una producción y separación simultánea del ácido acético utilizando una celda de electrosíntesis compuesta por 3 cámaras (anódica, catódica e intermedia) y una comunidad productora de ácido acético donde predominó el género *Clostridiales*. La fuerza electromotriz impulsó la migración del ácido acético de la cámara catódica hasta la cámara intermedia atravesando una membrana de intercambio aniónico para concentrar el ácido, alcanzando una concentración de 13.5 g L⁻¹, la cuál es la más grande reportada en sistemas bioelectroquímicos. Las ventajas de este diseño podrían ser: retrasar la inhibición por

sustrato en el cátodo, mejorar la estabilidad del pH, y obtener un producto más concentrado (Jansen, 2016).

Se ha demostrado que el uso de las membranas bipolares de electrodiálisis en la producción de ácidos orgánicos es económicamente aplicables (Fu *et al.*, 2014).

1.4. Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos como fuente de carbono para la producción de ácido succínico

Son pocos los compuestos químicos producidos a partir de azúcares derivados de residuos lignocelulósicos a gran escala, la mayoría son producidos a partir de azúcares obtenidos de almidón. Actualmente existen muchos desafíos para producir exitosamente algún compuesto químico a partir de residuos lignocelulósicos, por ejemplo, el rendimiento en la liberación de azúcares, bajar costos, alcanzar un proceso de separación sostenible, obtener el producto con la pureza requerida, alto rendimiento de recuperación, y la competencia con los compuestos químicos derivados del petróleo (Salvachúa *et al.*, 2016).

1.4.1. Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en México

En la República Mexicana se recolectan en promedio diariamente 86 342 toneladas de residuos sólidos urbanos. La CDMX y el Estado de México son las dos entidades federativas que registran la mayor proporción (19.7% y 9.6% respectivamente) del total nacional (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2011). Estos residuos no son enviados en su totalidad a una planta de tratamiento, sino se les deposita en rellenos sanitarios, se incineran o se tiran. De estos residuos el mayor componente es la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU). La FORSU comprende una mezcla de residuos como vegetales, restos de carne, comida, residuos de cocina, papel y desechos de jardín (Ghanavati *et al.*, 2015). La FORSU representa cerca del 60% de los residuos sólidos urbanos, en la Tabla 5 se muestra la composición de este porcentaje. La FORSU es un residuo de muy bajo costo y ampliamente disponible.

1.4.2. Otras consideraciones

La producción de H₂Succ por vía fermentativa a partir de cereales o azúcar de caña no es viable debido al problema de seguridad alimentaria, además no contribuye a reducir el costo en la producción de H₂Succ, por lo que se ha recurrido a utilizar

residuos lignocelulósicos como olote de maíz (Zhao *et al.*, 2016). Sin embargo, otros desechos como la FORSU tienen el potencial de obtener un jarabe glucosado para la producción de H₂Succ (Ghanavati *et al.*, 2015).

El pretratamiento con ácido diluido (PAD) de residuos lignocelulósicos como la FORSU, se ha propuesto como una estrategia para la obtención de monómeros de azúcar. En la ciudad de Isfahan, Iran se colectó en otoño la FORSU, y esta se hidrolizó con 3% de H₂SO₄ durante 45 min a 121 °C resultando en la liberación de 65.5 g L⁻¹ de azúcares, con un rendimiento de 0.33 g azúcares/g sustrato, el residuo sólido generado se sometió a una segunda hidrólisis, esta vez enzimática y reportaron una liberación de 30.5 g L⁻¹ de azúcares (Ghanavati *et al.*, 2015).

Tabla 5. Composición de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos para México.

Categoría	Subproductos	Residuos sólidos urbanos (%) ^a	FORSU (%) ^b
Susceptibles de aprovechamiento	Cartón	6.5	11.0
	Papel	6.2	10.4
	Envase de cartón encerado	1.5	2.5
	Cuero	0.5	0.9
	Fibra dura vegetal	0.7	1.1
Orgánicos	Residuos alimenticios	25.6	43.0
	Hueso	0.6	1.0
	Residuos de jardinería	9.4	15.78
Otros	Madera	1.3	2.9
	Pañal desechable	6.5	10.9
	Algodón	0.7	1.1

Notas: ^a Porcentaje del total de Residuos sólidos urbanos, ^b Porcentaje de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (INEGI, 2011).

1.5. Destoxificación del hidrolizado ácido de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos

La sacarificación de la FORSU u otro material lignocelulósico por PAD es efectiva para liberar los azúcares fermentables, sin embargo, estos vienen acompañados por inhibidores tanto del crecimiento como de la fermentación, como ácido acético, furfural, 5-(hidroximetil)furfural, compuestos fenólicos, ácido levulínico y ácido fórmico (Yu *et al.*, 2011). La concentración de los compuestos inhibidores dependerá de las condiciones de hidrólisis utilizadas y del tipo de material lignocelulósico. Por lo tanto, es recomendable realizar un tratamiento de destoxificación antes de que este licor sea utilizado como sustrato para el cultivo.

Entre los métodos de destoxificación reportados en hidrolizados por PAD, se han utilizado resinas de intercambio iónico, pretratamiento ultrasónico (Xi *et al.*, 2013), adsorción con carbón activado (Chen *et al.*, 2011), y sobre-adición de Ca(OH)_2 . En este último se logran precipitar los compuestos inhibidores, debido a la formación sales insolubles con el H_2SO_4 (Martínez *et al.*, 2001). Estos y otros tratamientos se han utilizado de manera independiente, aunque es posible aplicarlos de manera conjunta.

El cascarón de huevo en polvo (CHP) ha probado ser un adsorbente útil, y se ha examinado la adsorción de varios contaminantes en la última década, por ejemplo: arsénico (Oke *et al.*, 2008), compuestos fenólicos (Daraei *et al.*, 2013) e iones metálicos (Zheng *et al.*, 2007), sin embargo, la aplicación de CHP para la remoción de compuestos inhibidores en los hidrolizados aún no ha sido reportada.

2. JUSTIFICACIÓN

Entre las problemáticas que enfrenta la humanidad, existen dos grandes preocupaciones, la primera es la dependencia de petróleo para la síntesis de productos químicos, unido a la inminente escasez del petróleo que se avecina y los problemas ambientales que genera su uso y la segunda problemática es la gestión de desechos orgánicos urbanos.

Las CESIMs son una alternativa atractiva, ya que a partir de una fuente de carbono que hasta puede ser un residuo y electricidad son capaces de sintetizar compuestos de interés industrial. Sin embargo, la investigación en esta área es incipiente, son muy pocos los trabajos publicados en la producción de compuestos químicos por microorganismos impulsados con electricidad, además, es necesario superar grandes barreras como costos económicos, materiales de electrodos, membranas, microorganismos, etc.

Por lo anterior, el presente trabajo abarca desde la evaluación de pretratamientos con H_2SO_4 diluido a la FORSU para utilizar los hidrolizados en la electrofermentación, así como la construcción, caracterización y evaluación de la eficiencia energética y desempeño de CESIMs utilizadas en la producción de H_2Succ , la evaluación de una MIP de bajo costo, hasta el aislamiento y la posterior identificación taxonómica de un organismo productor de H_2Succ aislado de rumen de caprino.

3. HIPÓTESIS

Es posible la producción de H₂Succ por *A. succinogenes* a partir de hidrolizado de FORSU mediante una CESIM.

Hipótesis particulares

1. El hidrolizado ácido de la FORSU será rico en azúcares.
2. El CHP removerá eficientemente los compuestos inhibidores de la fermentación en el hidrolizado ácido de la FORSU.
3. *A. succinogenes* podrá crecer y producir H₂Succ a partir de hidrolizado de FORSU en una CESIM.
4. La utilización de una MIP de bajo costo en una CESIM para la producción de H₂Succ a pH cercano a neutro trabajará más eficientemente que una membrana de Nafion-117.
5. Se podrá aislar un organismo productor de H₂Succ a partir de muestra de rumen de caprino.
6. El organismo aislado tendrá una buena producción de H₂Succ en una CESIM.

4. OBJETIVOS

Evaluar la producción de H₂Succ por *A. succinogenes* en una CESIM a partir de hidrolizado de la FORSU.

Objetivos particulares

1. Evaluar el pretratamiento de hidrólisis ácida a la *FORSU* y elegir aquel donde exista una mayor cantidad de azúcares reductores disponibles para la fermentación.
2. Determinar la remoción de compuestos inhibidores de la fermentación en el hidrolizado ácido de la FORSU utilizando CHP
3. Evaluar la producción de H₂Succ por *A. succinogenes* en una CESIM a partir de hidrolizado de FORSU como sustrato utilizando una MIP de bajo costo con respecto a NF-117.
4. Aislar e identificar taxonómicamente un organismo productor de H₂Succ de rumen de caprino.
5. Evaluar la producción de H₂Succ de un organismo aislado de rumen de caprino en una CESIM.
6. Determinar los requerimientos de energía eléctrica y térmica para operar la CESIM y comparar desempeño energético en CESIMs destinadas la producción de H₂Succ.

5. METODOLOGÍA

5.1. Plan de trabajo

El presente trabajo experimental consta de una serie de 6 actividades (fig. 4).

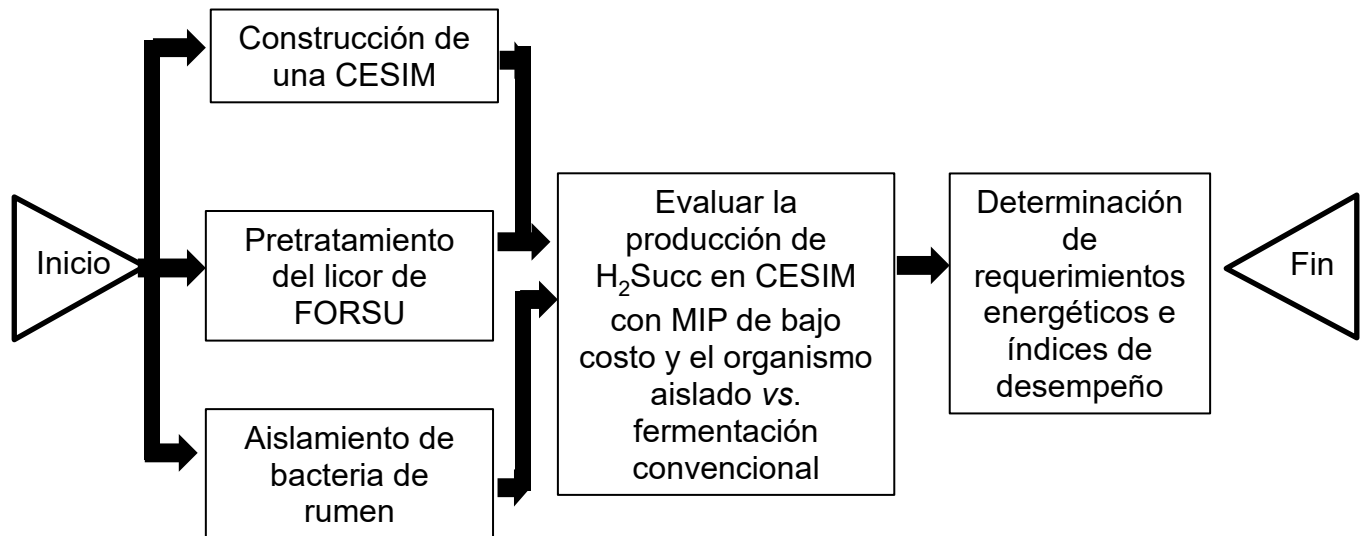


Figura 4. Plan de trabajo

La actividad 1 consistió en evaluar diferentes concentraciones de ácido sulfúrico como PAD para la hidrólisis de la FORSU. Y evaluar el CHP como adsorbente de compuestos inhibidores formados durante el PAD.

La actividad 2 hace referencia al diseño de una CESIM.

En la actividad 3 se sometió una muestra ruminal a una presión selectiva con el fin de encontrar un organismo productor de H₂Succ y una vez aislado se identificó por técnicas de biología molecular y pruebas bioquímicas.

En la actividad 4 se evaluó el rendimiento de una MIP de bajo costo sometida a las mismas condiciones que una membrana de NF-117 en una CESIM.

En la actividad 5 se analizó la producción de H₂Succ del organismo aislado en una CESIM.

En la actividad 6 se determinaron los requerimientos energéticos eléctricos y térmicos de la CESIM, con la finalidad de hacer un análisis de desempeño.

5.2. Actividades

5.2.1. Evaluación del pretratamiento de la fracción orgánica de residuos sólidos orgánicos para la obtención de azúcares reductores y técnicas de caracterización

5.2.1.1. Propósito

Evaluar pretratamientos ácidos del FORSU y elegir aquel donde exista una mayor liberación de azúcares reductores disponibles para la fermentación, así como acondicionar el hidrolizado obtenido eliminando compuestos inhibidores de fermentaciones

5.2.1.2. Diseño experimental

Se realizó la hidrólisis de la FORSU con un tratamiento con H_2SO_4 . Se siguió un modelo experimental diseño compuesto central y paso de ascenso, se escogió un diseño experimental 2^2 donde se seleccionaron dos factores, el primero la concentración de ácido sulfúrico y el segundo el tiempo de hidrólisis con dos niveles por factor, con los datos obtenidos se realizó el paso ascendente para llegar al punto cercano al punto óptimo en la liberación de AR. Para la destoxificación del hidrolizado obtenido, se realizó un diseño experimental 2^2 , uno de los factores fue el pH y el siguiente factor el tiempo de contacto con el CHP, como grupo control sólo se ajustó el pH sin añadir el adsorbente.

5.2.1.3. Programa de seguimiento y análisis

Para evaluar la eficiencia del pretratamiento se realizaron los análisis presentados en la Tabla 6 para y 7, los cuales se hicieron por triplicado y todas las muestras fueron congeladas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

Tabla 6. Parámetros de análisis y caracterización de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos

Parámetro	Método
Celulosa	Van Soest & Wine (1968)
Hemicelulosa	AOAC (1984)
Lignina	AOAC (1984)
Cenizas	AOAC (1984)

Tabla 7. Parámetros de análisis y caracterización del hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos

Parámetro	Método
pH	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> (2005)
Azúcares reductores	Miller (1959)
Ácido acético	Ghanavati <i>et al.</i> (2015)
Furfuran & 5-(hidroximetil)furfural	Ghanavati <i>et al.</i> (2015)
Fenoles solubles totales	Graham (1992)

5.2.1.4. Procedimientos y técnicas

5.2.1.4.1 Preparación de la FORSU

Se preparó un único lote de la FORSU a partir de residuos alimenticios y papel en suficiente cantidad para proveer el presente trabajo. Los residuos alimenticios se colectaron de la cafetería del CINVESTAV unidad Zacatenco y del mercado local (Fig. 5D). Del mercado local en su mayoría se colectó el desperdicio de lechugas y otras hortalizas (Fig. 5A y 5B), mientras que de la cafetería se recolectaron cáscaras de fruta principalmente papaya (Fig. 5C). En una primera etapa los residuos orgánicos se secaron a campo abierto hasta sentirse rígidos y tener una humedad que no fuera detectable al tacto, posteriormente se colocaron estos residuos en un horno a 60 °C por 24 h, con el fin de eliminar cualquier humedad residual. Con respecto a los papeles se colectaron en tiras de los desechos de las áreas administrativas. Posteriormente, de forma individual los residuos alimenticios y el papel se hicieron pasar por un molino de martillos para ser triturados. Los residuos orgánicos vegetales se tamizaron en una malla núm. 40 (420 µm) (Escamilla-Alvarado, 2009; Zhao *et al.*, 2016). Ambos residuos se almacenaron en recipientes cerrados a temperatura ambiente hasta su uso.

Los residuos alimenticios y el papel se mezclaron en una relación 60 y 40% base seca respectivamente para formar la FORSU (Silverstein *et al.*, 2007; Escamilla-Alvarado, 2009; Bahcegul *et al.*, 2011).

5.2.1.4.2. Determinación de la relación de la carga FORSU con el volumen de ácido diluido

Para definir la capacidad de retención de agua de la FORSU, se empleó una técnica simple ligeramente modificada prestada de edafólogos (Flores-Delgadillo & Alcalá-

Martínez, 2010), se colocó 1 g de FORSU en un filtro Gooch, se registró su peso constante manteniendo la muestra en un horno a 60 °C por 24 h, posterior se puso en remojo por 5 min en agua destilada, se dejó escurrir y se pesó, la fracción de humedad total se consideró como la capacidad de retención de agua. Se realizó por triplicado.

Se colocaron 5 g de FORSU en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, al cual se le agregó la solución con la concentración de H₂SO₄, según corresponda dicha solución tendrá un volumen de 10 a 20 mL, estos matraces se colocaron en la autoclave por 17 min. Posteriormente se evaluó el contenido de azúcares reductores (AR) obtenidos.



Figura 5. Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos. (A & B) Residuos vegetales obtenidos del mercado local. (C) Residuos vegetales obtenidos del comedor de CINVESTAV Zacatenco. (D) Típico negocio de venta de hortalizas en un mercado.

5.2.1.4.3. Tratamiento ácido diluido

(i) Diseño experimental del tratamiento ácido diluido

Los ensayos de pretratamiento con ácido diluido se realizaron en matraz Erlenmeyer con capacidad de 250 mL, y fueron cargados con 5 g de FORSU con la solución de ácido diluido en una relación sólido-líquido 1:10 (p/v). para después ser colocados en un autoclave a 121 °C y 15 psi, donde las dos variables independientes fueron la concentración de ácido sulfúrico (X₁) y el tiempo de operación (X₂).

Un diseño factorial 2² fue realizado con tres réplicas y cinco puntos centrales para explorar los niveles cercanos a los niveles óptimos en la variable de respuesta que fue la liberación de AR, los valores reales y codificados en su nivel bajo y alto se muestran en la Tabla 8. Un análisis de regresión lineal fue utilizado para ajustar los

datos obtenidos del diseño factorial 2^2 con un modelo de primer orden (Ec. 1), despreciando la interacción en primera instancia (Montgomery, 2009).

$$Y_{ij} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 X_{1i} + \hat{\beta}_2 X_{2i} + \varepsilon_{ij} \quad [1]$$

donde Y_{ij} es la respuesta predicha, $\hat{\beta}_j$ representa los coeficientes y X_i son los factores. La importancia del factor fue predicha con la Ec. 1, y entonces el método del paso ascendente fue aplicado con la finalidad de mejorar el rendimiento, tomando como variable de respuesta los AR liberados (Ec. 2).

$$AR = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 \times [H_2SO_4] + \hat{\beta}_2 \times [t_{oper}] + \varepsilon_{ij} \quad [2]$$

donde AR, significa azúcares reductores en $g L^{-1}$, H_2SO_4 es el porcentaje de ácido sulfúrico (v/v) y t_{oper} es el tiempo de operación en minutos

Para separar el hidrolizado del residuo sólido se utilizó un embudo Büchner y se separó mediante vacío el líquido del sólido, ambos se guardaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis y/o su utilización (Zhao *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2010a).

Tabla 8. Niveles experimentales de las dos variables independientes

Núm. de corrida	Variables codificadas		Variables reales	
	X_1 (H ₂ SO ₄)	X_2 (Tiempo)	H ₂ SO ₄ (%) ^a	Tiempo (min)
1	-1	-1	1	10
2	1	-1	3	10
3	-1	1	1	20
4	1	1	3	20
5	0	0	2	15

^a El porcentaje expresado en v/v.

(ii) Análisis del hidrolizado

Las técnicas utilizadas para esta actividad se describen en el Anexo 1

5.2.2. Determinación del comportamiento adsorptivo del cascarón de huevo en polvo

5.2.2.1. Propósito

En esta actividad se propuso remover los inhibidores presentes en el hidrolizado de la FORSU utilizando CHP.

5.2.2.2. Diseño experimental

Cinética de adsorción

Los experimentos en lote para la cinética se llevaron a cabo con concentraciones fijas tanto de adsorbente CHP 6 % (p/v) como de composición de compuestos inhibidores en el hidrolizado de FORSU (Tabla 15). Se realizó un diseño de tres factores con niveles mixtos, los factores evaluados fueron el CHP (dos niveles: sin CHP y con CHP), el pH (cuatro niveles: pH 3, 6, 9 y 11) y el tiempo de contacto varió de 0 a 6 h con intervalos de treinta minutos (13 niveles). Las variables de respuesta fueron los compuestos fenólicos, azúcares reductores, 5-(hidroximetil)furfural (HMF) y ácido levulínico. Cada tratamiento contó con tres réplicas (excepto la curva de calibración, la cual se realizó con al menos 6 puntos) sumando un total de 312 corridas. Con los datos obtenidos se pusieron a prueba dos modelos cinéticos de primer y segundo orden. En la Tabla 9 se muestran las ecuaciones no lineales y lineales.

Tabla 9. Formas linealizadas y no linealizadas de los modelos cinéticos de adsorción

Notas: k_1 y k_2 representan los coeficientes de reacción del primer y segundo orden, respectivamente.

Modelo	No lineal	Lineal
Primer orden	$\frac{dq}{dt} = k_1(q_e - q)$ [3]	$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t$ [4]
Segundo orden	$\frac{dq}{dt} = k_2(q_e - q)^2$ [5]	$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t$ [6]

Referencias: Ho, 1995; Tsai & Juang, 2000; Azizian, 2004; Lin *et al.*, 2007; Koner *et al.*, 2013.

Isoterma de adsorción

Para realizar la isoterma de adsorción se mantuvo fija la cantidad de adsorbente y se varió la concentración de compuestos fenólicos en el rango de 49.2 a 146.4 mg L⁻¹ equivalentes a ácido gálico. Se realizaron experimentos en lote. Viales con capacidad de 100 mL se les agregó CHP al 6 % (p/v) y 25 mL de hidrolizado de FORSU. Dos modelos Lineal y Freundlich fueron utilizados y evaluados por su habilidad de describir los datos experimentales.

5.2.2.3. Programa de seguimiento y análisis

En la Tabla 10 se muestran los análisis empleados en las determinaciones de los hidrolizados una vez que fueron destoxificados.

Tabla 10. Caracterización de los hidrolizados destoxificados

Parámetro	Método
Fenoles totales	azul de Prusia (Graham, 1992)
Azúcares reductores	DNS (Miller, 1959)
Ácido levulínico y 5-(hidroximetil)furfural	CG-FID

La concentración total de compuesto fenólicos en el hidrolizado y en el hidrolizado destoxificado fue cuantificado por el método de azul de Prussia (Graham, 1992), debido a que a diferencia del método de Folin-Ciocalteu, este método no sufre interferencia al existir presencia de azúcares, además de que el tiempo de reacción es aproximadamente 3 veces menor (Margraf *et al.*, 2015). Se utilizó ácido gálico para realizar la curva de calibración (15 mg L⁻¹).

La caracterización del adsorbente se realizó mediante difracción de rayos X, un difractómetro con radiación CuK α (PANalytical modelo X-Pert Pro MRD, Almelo,

Países bajos) fue usado para conocer el patrón de difracción de rayos X y la visualización en microscopio electrónico de barrido utilizando el equipo Carl Zeiss Auriga 3916 – Field Emission Scanning Electron Microscopy (Jena, Alemania). La longitud de la partícula se determinó utilizando el programa ImageJ 1.51k (Wayne Rasband National Institutes of Health, Bethesda, Maryland USA. <http://imagej.nih.gov/ij> Java 1.6.0_24).

5.2.2.4. Procedimientos y técnicas

Se colectó el cascarón de huevo de la panadería local “Pastelerías Esperanza”, el cual se lavó con agua de grifo y se enjuagó con agua destilada, posterior se secó en un horno a 60 °C durante 24 h, una vez seco se trituró en un molino de martillos, finalmente se tamizó en una malla en malla núm. 60 (<0.25mm) para obtener el CHP que se almacenó en un recipiente cerrado mantenido a temperatura ambiente hasta ser utilizado.

Cinética de adsorción

Los experimentos de cinética de adsorción fueron llevados a cabo en matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 mL. 100 mL de hidrolizado de FORSU no destoxificado ajustado al pH requerido según cada tratamiento y 6% de CHP (p/v) en los tratamientos con CHP fueron cargados a los matraces. El pH en todos los tratamientos se ajustó al pH deseado agregando $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al hidrolizado de FORSU en agitación constante hasta que se alcanzó el pH requerido. Se agitó en todos los tratamientos en una agitadora orbital a 300 rpm (marca IKA® modelo KS 260 basic, Labtec. North Carolina, USA).

De cada frasco se tomó una muestra de 1 mL cada 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a 10 000 g durante 10 minutos para remover el adsorbente. El sobrenadante fue almacenado a -20 °C, hasta que se requirió para realizar determinaciones.

Los azúcares reductores se cuantificaron de acuerdo con Miller (1959). La determinación de compuestos fenólicos totales se realizó de acuerdo con Graham (1992).

Determinación de 5-(hidroximetil)furfural y ácido levulínico

HMF y ácido levulínico fueron cuantificados con un cromatógrafo de gases (GC-FID), la separación fue realizada en una columna ZEBRON ZB-FFAP (15 m x 0.53 x 1.0 μm). La temperatura de la columna se mantuvo a 90 °C durante 3 min. Posteriormente se realizaron dos rampeos de temperatura, el primero consistió de un incremento de la temperatura de la columna de 20 °C cada minuto hasta alcanzar 200 °C. El segundo rampeo la temperatura se volvió a incrementar 30 °C cada minuto hasta que finalmente alcanzó los 250 °C. La temperatura del detector fue de 280 °C y la del inyector fue de 230 °C. Se utilizó nitrógeno como fase móvil a una presión de 11 psi.

5.3. Diseño y construcción de una celda de electrosíntesis microbiana para la producción de ácido succínico

5.3.1. Propósito

Para llevar a cabo las electrofermentaciones se diseñó y construyó una CESIM con las características adecuadas para que se lleve a cabo la producción de H_2Succ . De acuerdo con los antecedentes y la experiencia en el grupo de trabajo se elaboraron los planos para la construcción de una CESIM, la cual fue construida por el taller del CINVESTAV, a partir de acrílico de 1 pulgada de espesor.

La celda fue construida por el taller del CINVESTAV unidad Zacatenco, fabricada con acrílico de 1 pulgada (Lucita), con capacidad para sostener cultivos anaerobios. La celda estuvo compuesta por una doble cámara (cámara anódica y catódica), divididas por un separador, dichas cámaras se perforaron en sus costados, de tal forma que fuera posible unir las por tornillos y para evitar fugas se le colocaron empaques.

5.3.2. Características de la celda de electrosíntesis microbiana

Cada compartimento contó con las siguientes medidas 5x2x20cm (Fig. 5) y una capacidad total de 200 ml y un volumen de trabajo de 180 ml, el espacio de cabeza fue llenado con CO_2 (Gildemyn *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016).

Esta celda consistió de dos electrodos (ánodo y cátodo) de tela de carbono (de espesor; $12 \text{ cm}^2\text{g}^{-1}$ [5cm x 20 cm, 100 cm^2]), cada electrodo se conectó a un alambre de acero inoxidable (1 mm de diámetro); el alambre atravesó la tela de carbono en su parte superior central perforando 1 cm, se le realizó un pequeño doblez al alambre para asegurarlo; en el otro extremo del alambre se sujetó a una aguja de uso doméstico

de acero inoxidable, debido a que la CESIM estuvo sometida a agitación (180 rpm) y la susceptibilidad del alambre a romperse, finalmente la aguja se conectó a la fuente de poder.

El monitoreo del voltaje se registró mediante un Arduino UNO (El código para programación en Arduino para el monitoreo de voltaje en las CESIM se muestra en el Anexo 9) y la intensidad fue registrada mediante un multímetro digital ESCORT modelo 3136A o 3146A; ambos dispositivos fueron conectados mediante una interface cable estándar USB y un RS-232, respectivamente.

La energía se suministró mediante una fuente de poder regulable casera que consistió de un adaptador c.c./c.a (convertidor de corriente directa a corriente alterna; cargador de batería de celular LG modelo TA25GT2), regulador lm317 (Fig. 6B), un disipador de calor, un potenciómetro 10K (Fig. 6C), y una resistencia 1K (Fig. 6).

La membrana de intercambio protónico Nafion® 117 es resistente al calor (Bajracharya *et al.*, 2015), por lo cual se esterilizó en autoclave. El voltaje se mantuvo constante a 1.8 V, mientras que el valor de la intensidad se registró (Park *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2016). El pH en la cámara catódica fue controlado mediante la adición inicial de $MgCO_3$, a una temperatura de 37 °C (Fig. 7).

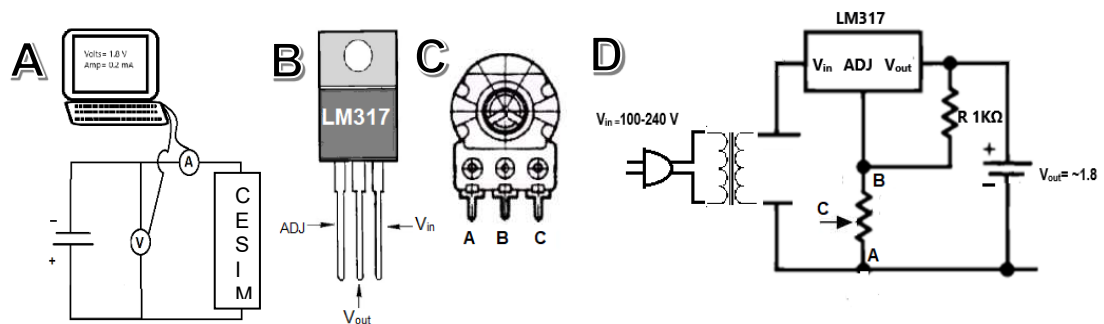


Figura 6. Diagramas de conexiones de la celda de electrosíntesis microbiana. (A) Diagrama general del circuito eléctrico de la celda de electrosíntesis microbiana con conexiones para monitoreo del voltaje e intensidad (celda de electrosíntesis representada como resistencia). (B) Regulador de tensión lineal ajustable LM317. (C) Potenciómetro B10K. (D) Diagrama del circuito eléctrico de la fuente de alimentación

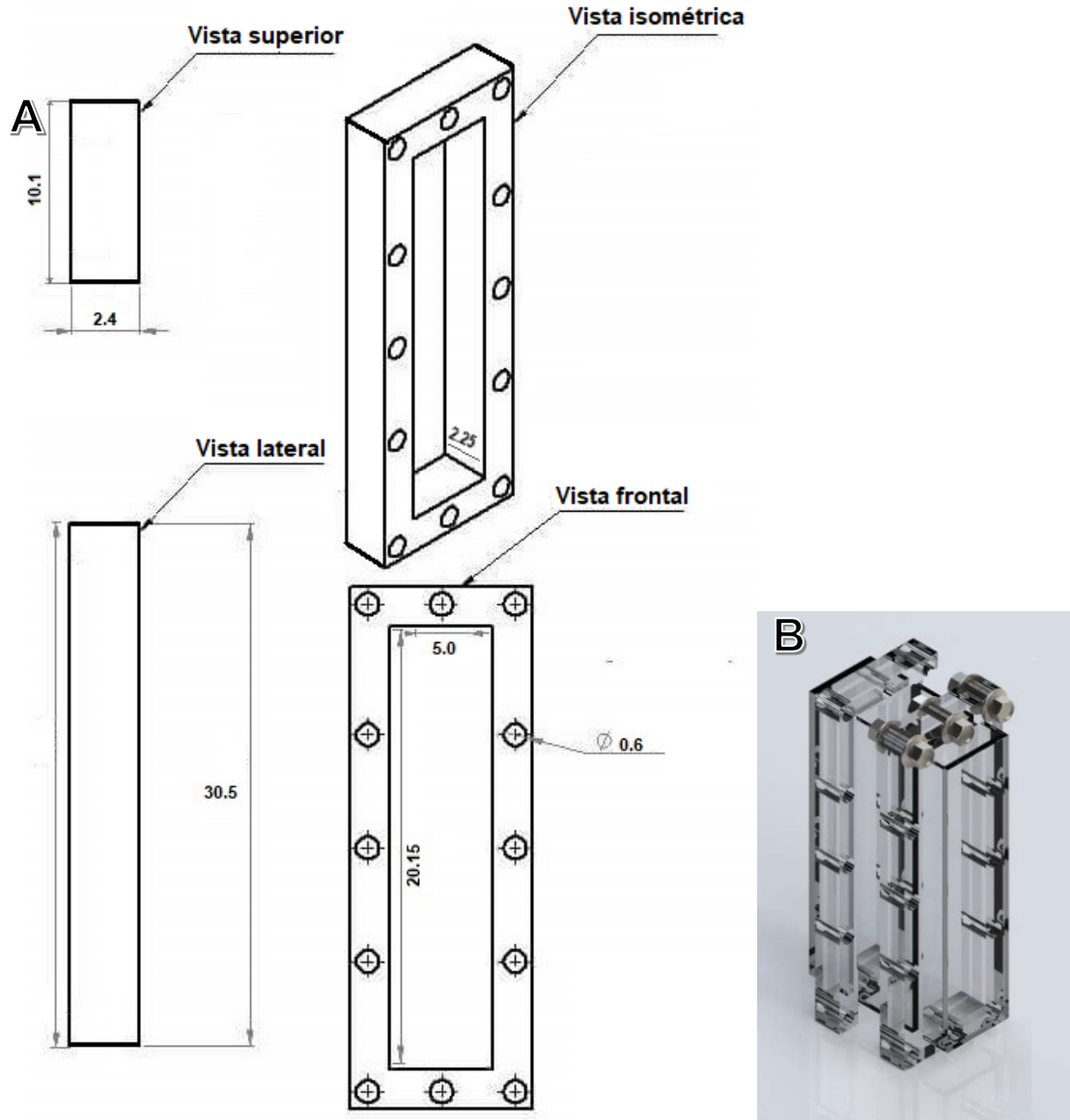


Figura 7. Configuración de la celda de electrosíntesis microbiana. (A) Plano de las cámaras anódica o catódica de la celda de electrosíntesis microbiana; las medidas están dadas en cm; (B) Celda de electrosíntesis microbiana ensamblada. SolidWorks® 15 versión de estudiante (Corp. Waltham, Massachusetts, USA).

5.4. Aislamiento de un microorganismo productor de ácido succínico de rumen de caprino e Identificar el organismo aislado mediante el análisis de la subunidad ribosomal 16s y pruebas bioquímicas.

5.4.1. Propósito

Con la finalidad de obtener un organismo productor de H₂Succ se sometió líquido ruminal de caprino a una presión selectiva con antibióticos, favoreciendo el crecimiento de organismos productores de H₂Succ, seleccionar el mayor productor e identificarlo analizando la secuencia de la subunidad ribosomal 16s.

5.4.2. Diseño experimental

Se realizó el aislamiento de una bacteria productora de H₂Succ a partir de muestras de rumen de caprino y se analizó la secuencia de la subunidad ribosomal 16s, se validó la identificación molecular con pruebas bioquímicas.

5.4.3 Programa de seguimiento y análisis

En la Tabla 11 se muestran los análisis empleados como parámetro para seleccionar al microorganismo aislado productor de H₂Succ

Tabla 11. Parámetros de análisis de producción de ácido succínico de microorganismos aislados a partir de rumen de caprino

Parámetro	Método
Ácidos orgánicos y azúcares	HPLC-RID
pH	Indicador (rojo fenol)

5.4.4. Procedimientos y técnicas

5.4.4.1. Muestras de rumen

La muestra de rumen fue donada por el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA), UNAM ubicado en Topilejo, Tlalpan, Ciudad de México. Miembros del CEPIPSA extrajeron una muestra del contenido ruminal de un caprino de la raza Alpina francesa, de sexo hembra, de aproximadamente 7 años de edad, y un peso cercano a los 55 kg. La alimentación del rumiante consistió hasta el momento de la muestra en avena, ensilado y mezcla comercial. Después de mediodía, se extrajeron 10 mL de muestra por sonda esofágica, la cual, se diluyó al 20% en medio base, para posteriormente filtrarla a través de una gasa estéril,

finalmente se inoculó el líquido ruminal filtrado en un vial gaseado con CO₂ sellado anaeróticamente que contenía 100 mL de medio base.

5.4.4.2. Condiciones del cultivo

Se inocularon 10 viales sellados anaeróticamente en una atmosfera de CO₂, los cuales contenían 100 mL de medio base adicionado con dos antibióticos 16 mg lasalocid L⁻¹ y 10 mg monensina L⁻¹, que son inhibidores de microorganismos ruminales que producen ácido acético e H₂, respectivamente, favoreciendo el crecimiento de bacterias productoras de ácido propiónico (Lee *et al.*, 2002 & Salem *et al.*, 2011). El medio base es un modificado de Lee *et al.* (2002): 20 g L⁻¹ de dextrosa, 5 g L⁻¹ de peptona de caseína, 5 g L⁻¹ de extracto de levadura, 3 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 2 g L⁻¹ de NaCl, 2 g L⁻¹ de (NH₄)SO₄, 0.15 g L⁻¹ de CaCl₂·H₂O, 0.4 g L⁻¹ de MgCl₂·6H₂O, 8.3 g L⁻¹ de CaCO₃, 8 g L⁻¹ de NaCO₃. Los cultivos líquidos fueron mantenidos a una temperatura de 37 °C, agitación a 220 rpm durante 48 h (Lee *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2014a).

El cultivo fue diluido 10⁻⁶ en buffer fosfato salino (8.47 g L⁻¹ de NaCl y 1.38 g L⁻¹ de NaH₂PO₄·H₂O g L⁻¹). Del cultivo diluido se tomó 0.1 mL y se distribuyó sobre agar contenido en cajas Petri en una cabina anaerobia, se frotó la dilución sobre la superficie del agar con un asa de Drigalski, las cajas Petri se colocaron en una cámara de anaerobiosis, se garantizaron las condiciones anaerobias colocando dentro de la cámara de anaerobiosis un GasPack y por último dicha cámara se mantuvo a 37 °C. Cada caja Petri contenía un medio sólido modificado de Lee *et al.* (2002): 5 g L⁻¹ de dextrosa, 23 g L⁻¹ de peptona, 5 g L⁻¹ de extracto de levadura, 12 g L⁻¹ de BactoAgar, 3 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 2 g L⁻¹ de NaCl, 0.4 g L⁻¹ de NaHCO₃, 0.5 g L⁻¹ de cisteína HCl, 0.01 g L⁻¹ de hemoglobina, 0.001 g L⁻¹ de vitamina K, y 0.011 g L⁻¹ de rojo fenol. El medio fue gaseado con CO₂ libre de oxígeno y esterilizado por 15 minutos a 121 °C y 15 psi (Lee *et al.*, 2002).

Después de 24 a 48 h las colonias individuales fueron recogidas con una aguja estéril (27gx13mm) e inyectadas a viales con medio enriquecido con los antibióticos lasalocid y monensina y 0.011 g L⁻¹ de rojo fenol, de estos viales, a las 24 h se evaluó la producción de H₂Succ (Playne, 1985).

Los organismos aislados fueron cultivados anaeróticamente en botellas conteniendo el medio MH (Lee *et al.*, 2002): 6.0 g L⁻¹ de dextrosa, 5.0 g L⁻¹ de extracto

de levadura, 8.4 g L⁻¹ de NaHCO₃, 8.5 g L⁻¹ de NaH₂-PO₄H₂O, 15.5 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 1.0 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0.2 g L⁻¹ de MgCl₂ 6H₂O y 0.2 g L⁻¹ de CaCl₂. Después de 24 h de crecimiento a 37 °C con agitación a 220 rpm, se preparó una solución de glicerol al 50%, la cual sirvió para preservar los organismos aislados mezclándola con el medio de cultivo en una relación 1:1. Se conservaron los inóculos a -70 °C, hasta que fue requerido el organismo con mayor producción de H₂Succ para los ensayos en la CESIM.

5.4.4.3. Cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos

Las muestras fueron centrifugadas a 10 000 g durante 10 min y el sobrenadante fue utilizado para cuantificar AR por DNS (Miller, 1959) y ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos fueron cuantificados por HPLC equipado con un detector de índice de refracción (RID). Se usó una columna Agilent Hi-plex H a 60 °C con 0.5 mM de H₂SO₄ como fase móvil a un flujo de 0.6 mLmin⁻¹ (Benjelloun *et al.*, 2005; Hepburn & Daugulis, 2012; Kloetzer *et al.*, 2013). El volumen de inyección fue 20 µL.

5.4.4.4. Identificación de producción de hidrógeno

La producción de H₂ en el espacio gaseoso se cuantificó en un cromatógrafo de gases GOW-MAC modelo 350 equipado con detector de conductividad térmica (TCD). La temperatura del inyector y la columna se mantuvieron en 80 °C, mientras que la temperatura del detector 100 °C, usando argón como gas acarreador. Se utilizó una columna empacada gel de sílice 60/80 de diámetro (0.25/0.18 mm). El volumen de inyección fue de 1 mL (Romero-Cedillo, 2015).

5.4.4.5. Secuenciación de la subunidad ribosomal 16s

Se realizó la extracción del DNA de un cultivo maduro de la bacteria aislada utilizando el PowerSoil® DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories Inc., Carlsbad, California, USA). El gen de la subunidad ribosomal 16s fue amplificado en un termociclador Eppendorf Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf, Hamburg, Alemania) bajo las siguientes condiciones: Una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C; seguida por 35 ciclos, cada uno consistiendo de 0.75 min de desnaturalización, 1 min de alineamiento a 58.5 °C y 1.5 min de extensión a 72 °C, la extensión final se realizó a 72 °C por 3 min, finalmente los productos de reacción fueron mantenidos a 4 °C hasta su uso. Se utilizaron los oligonucleótidos propuestos por Lee *et al.* (2002) ligeramente modificados

para la amplificación 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3' y 5'-AAGGAGRTGWTCCARCC-3', correspondiendo a las posiciones 8-27 y 1545-1525, respectivamente de la secuencia de *E. coli* 16s RNA (Stackebrandt & Goodfellow, 1991). El producto de PCR fue purificado mediante el Molecular Biology Kit (BioBasic Inc., Marckham, Ontario, Canadá) Se obtuvo una concentración promedio de 15 ng μl^{-1} .

La secuenciación del gen de la subunidad ribosomal 16s fue realizada por el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales del CINVESTAV, con el cual se obtuvieron dos secuencias por cada oligonucleótido. Las secuencias fueron editadas manualmente por medio del programa Chromas 2.4 (Technelysium® Pty. Ltd. Helensvale, Australia) conformando una secuencia consenso. La secuencia consenso se comparó con la base de datos del GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando el programa nucleotide BLAST del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) para encontrar similitudes entre secuencias biológicas.

Las secuencias consenso se alinearon junto con las resultantes de la búsqueda BLAST, con el programa Clustal W incluido dentro del programa MEGA 6.0 (Tamura, *et al.* 2013) para realizar un dendrograma total con el método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) para observar las similitudes entre secuencias de especies tipos definidas, que resultaron relacionadas en el programa de BLAST.

La identificación de la bacteria se corroboró mediante el kit API 20e (Biomériux, Inc., Hazelwood, Missouri, USA). Y registrando su crecimiento en medio de cultivo selectivo y diferencial *Salmonella-Shigella*.

5.5. Evaluación de la producción de ácido succínico a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos mediante una celda de electrosíntesis microbiana evaluando Nafion *versus* agar como separadores o *A. succinogenes versus Caprina EHC* como biocatalizador.

5.5.1. Propósito

Usar una MIP (membrana de agar al 2%) directamente en una CESIM para separar en ánodo del cátodo y comparar su rendimiento bajo las mismas condiciones que una

membrana modelo NF-117 y evaluar la producción de H₂Succ del organismo aislado en una CESIM y comparar dicha producción con lo obtenido por *A. succinogenes*.

5.5.2. Diseño experimental

El experimento se analizó como un factor a cuatro niveles. Los resultados condujeron a ANOVAS y además se realizó la dócima múltiple de medias de Duncan para determinar eventuales diferencias significativas entre medias (Mongomery, 2009).

El diseño experimental consistió de cuatro tratamientos, del tratamiento T1 al tratamiento T4 se les aplicó energía eléctrica (1.8 V). Hubo tres controles T5 al T7 con fermentaciones sin electricidad o también llamadas fermentaciones convencionales. Se evaluaron los siguientes contrastes, el primero fue el tipo de separador, teniendo dos niveles la membrana de Agar al 2% (T1) vs. la membrana Nafion (T2). El siguiente contraste fue el tipo de microorganismo inoculado, de igual manera se contó con dos niveles, el primero el microorganismo aislado de la sección 5.4. (T3) vs. *A. succinogenes*. Por último, se evaluó el tipo de regulador de pH: NaHCO₃ (T4) vs. MgCO₃ (Tabla 12).

Las variables de respuesta del experimento fueron masa del H₂Succ obtenida en cada tratamiento, el rendimiento de H₂Succ, la relación ω que señala la relación entre el H₂Succ producido y los compuestos concomitantes, la relación ψ que compara la producción de H₂Succ y el costo del separador de la CESIM, el índice $\eta_{EF/fc}$ que compara el rendimiento de la electrofermentación vs. la fermentación convencional.

Tabla 12. Diseño experimental para evaluar el tipo de separador y el microorganismo empleado en la producción de ácido succínico a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos

Número de tratamiento	Microorganismo	Separador	Regulador de pH	Tipo de reactor/Volumen de trabajo (L)/Suministro de electricidad (Si/No)	pH inicial ánodo/cátodo
T1	<i>A. succinogenes</i>	Nafion	MgCO ₃	CESIM/0.18/Si	3/7.2
T2	<i>A. succinogenes</i>	Agar 2%	MgCO ₃	CESIM/0.18/Si	3/7.2
T3	Organismo aislado	Nafion	MgCO ₃	CESIM/0.18/Si	3/7.2
T4	<i>A. succinogenes</i>	Nafion	NaHCO ₃	CESIM/0.18/Si	7.2/7.2
T5	<i>A. succinogenes</i>	NA	MgCO ₃	Vial/0.075/No	3/7.2
T6	<i>A. succinogenes</i>	Nafion	NaHCO ₃	CESIM/0.18/No	7.2/7.2
T7	Organismo aislado	NA	MgCO ₃	Vial/0.075/No	3/7.2

CESIM: Celda de electrosíntesis microbiana, NA: No aplica.

5.5.3 Programa de seguimiento y análisis

Se determinó la producción de H₂Succ, así como los productos concomitantes, como se señala en el punto 5.4.4.3. y la biomasa por densidad óptica a una longitud de onda de 660 nm (DO₆₆₀) como se describe en la Tabla 13.

Tabla 13. Parámetros de análisis de producción de ácido succínico en celda de electrosíntesis microbiana a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos

Parámetro	Método
H ₂ Succ y productos concomitantes	HPLC-RID
Biomasa planctónica	DO ₆₆₀
Biomasa adherida a cátodo	Cuantificación de proteína: método modificado de Hartree-Lowry (Van Eerten-Jansen <i>et al.</i> 2013)

5.5.4. Procedimientos y técnicas

5.5.4.1. Microorganismo y preparación del inóculo

A. succinogenes 130Z (DSM 22257) fue obtenida de la Colección de Microorganismos y Cultivos Celulares Alemana DSMZ a través de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV, México; fue reactivada en una placa de cultivo infusión corazón-cerebro (37 g L⁻¹).

Para preparar una solución stock la cepa fue crecida en botellas selladas anaerómicamente conteniendo 30 mL de medio de caldo de soya tripticaseína con CO₂ como fase gaseosa, conteniendo lo siguiente: 17.0 g L⁻¹ de peptona de caseína, 3.0 g L⁻¹ de peptona de soya, 5.0 g L⁻¹ de NaCl, 2.5 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 2.5 g L⁻¹ de dextrosa. Después de 24 h a 37 °C, alícuotas de 0.5 mL fueron colocadas en microtubos que contenían 0.5 mL de glicerol (v/v). Los viales fueron almacenados a -70 °C (Meynial-Salles *et al.*, 2008). Posterior, la reactivación de *A. succinogenes* se hizo inoculando tubos con caldo de soya tripticaseína, para aclimatar la cepa al hidrolizado se hizo crecer en hidrolizado de FORSU destoxificado con carbón activado al 2% y adicionado con sales minerales: 15 g L⁻¹ de extracto de levadura, 1.5 g L⁻¹ de NaH₂PO₄·H₂O, 1.5 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 0.2 g L⁻¹ de CaCl₂, 0.2 g L⁻¹ de MgCl y 1 g L⁻¹ de NaCl, se incubó a 37 °C, y se cosecharon las células a las 24 h centrifugando a 8 000 g durante 5 min.

Las células se lavaron con buffer fosfato salino estéril (PBS): 8.06 g L⁻¹ de NaCl, 0.22 g L⁻¹ de KCl; 1.15 g L⁻¹ de Na₂HPO₄, 0.2 g L⁻¹ de KH₂PO₄. Se ajustó la biomasa inicial a 9.5 mg L⁻¹. Las células se resuspendieron con hidrolizado de FORSU destoxificado adicionada con sales minerales como se describe en el punto 5.5.4.2. El cultivo volumen de inoculación fue 10%.

5.5.4.2. Composición de medio en celda de electrosíntesis

En la cámara catódica: 15 g L⁻¹ de extracto de levadura, 40 g L⁻¹ de MgCO₃, 1.5 g L⁻¹ de NaH₂PO₄, 1.5 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 0.2 g L⁻¹ de MgCl₂, 0.2 g L⁻¹ de CaCl₂, 1.0 g L⁻¹ de NaCl, 5x10⁻³ g L⁻¹ de D-(+)-Biotina y 0.0288 g L⁻¹ de rojo neutro; El pH del medio se ajustó a 7.2 antes de esterilizar. La D-Biotina y el rojo neutro fueron esterilizados mediante un equipo de filtración a través de una membrana (0.22 μm) por separado, se preparó el stock de biotina disolviéndola en 1 M de NaOH. La cámara anódica fue cargada con la siguiente solución: 23.5 g L⁻¹ de Na₂HPO₄, 13.8 g L⁻¹ de NaH₂PO₄·H₂O, 5.8 g L⁻¹ de NaCl y el pH se ajustó a 3 (Park *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010b; Yu *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2014; Gildemyn *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016; Salvachúa *et al.*, 2016).

5.5.4.3. Síntesis de la membrana de agar al 2%.

Se seleccionó esta membrana debido a su síntesis sencilla y su bajo costo, además de su alta eficiencia a largo plazo, así mismo, está reportado que presenta un valor

alto en un índice que toma en cuenta la relación potencia/costo (Kim *et al.*, 2009; Hernández-Flores, 2015).

El procedimiento planteado por Hernández-Flores (2015), acoplado para resultar en una membrana estéril para la síntesis de la membrana de agar al 2% (Derivados de Algas Rojas del género *Gelidium*) se describe a continuación:

1. Se preparó una solución con agua destilada, agar al 2% (p/v) en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, y se calentó para disolver el agar.
2. El matraz se colocó en una autoclave a 121 °C y 15 psi de presión por 15 min.
3. La solución se vertió líquida en un recipiente estéril calculando se alcanzó un espesor de 5 mm, en la relación planteada por Hernández-Flores *et al.* (2015).
4. El recipiente con la membrana de agar se colocó en un horno a 70 °C por 10 h o hasta que haya alcanzó su peso constante.

5.5.4.4. Condiciones de la fermentación

La CESIM, que está hecha de acrílico, y se esterilizó colocándola por 4 h en una solución de hipoclorito de sodio al 5.6%. La concentración de cloro libre se determinó por yodometría estandarizando la solución de tiosulfato de sodio contra yodato de potasio (Machado *et al.*, 2014 basado en Vogel, 2002; Técnica descrita en Anexo 3).

La CESIM se inoculó al 10% (18 mL), y únicamente se inoculó la cámara catódica. Se aseguraron condiciones anaerobias en la cámara catódica, mediante gaseo con CO₂ (a través de un filtro estéril de 0.22 µm). Se colocó directamente en la CESIM la membrana para ser evaluada, tomando en cuenta la producción de H₂Succ, biomasa y relación del H₂Succ con otros ácidos orgánicos como variable de respuesta. El diseño experimental consistió de un factor con dos niveles, la membrana de bajo costo y la membrana de Nafion 117®. Se agitó a 180 rpm y se mantuvo a una temperatura de 37 °C. El grupo control consistió en una fermentación en viales bajo las mismas condiciones de operación sin electricidad.

Determinación de biomasa

La biomasa suspendida en el medio (biomasa planctónica) fue registrada y se relacionó mediante una curva patrón que relaciona la densidad óptica a 660 nm (DO₆₆₀) con el peso seco. En el presente trabajo una DO₆₆₀ de 1.0 representó 947 mg de peso

seco por L (Xi *et al.*, 2012). Cada muestra de medio de cultivo se centrifugó a 10 000 g durante 10 min y el sobrenadante se analizó para azúcares y ácidos orgánicos. Subsecuentemente la pastilla se suspendió en 1 mL de 0.15 M de H₂SO₄. Después se centrifugó en las mismas condiciones, se desechó el sobrenadante y se volvió a suspender la pastilla en 1 mL de 0.15 M de H₂SO₄. Posterior se hicieron tres lavados con agua destilada, para asegurar la solubilidad del MgCO₃ remanente (Yu *et al.*, 2010).

La concentración de proteína por gramo de electrodo fue determinada por el método modificado de Hartree-Lowry descrito por Van Eerten-Jansen *et al.* (2013). Con él se cuantificó la densidad de biomasa formando biopelícula sobre el cátodo [biomasa adherida al electrodo, ya sea cátodo o ánodo expresada como mg g⁻¹ de electrodo] sujeta al electrodo al final de la fermentación. Un área conocida del electrodo no menor a (0.005 m²) se suspendió en 25 mL de 1 M de NaOH, se agitó vigorosamente por 30 s, y se colocó a 46 °C por 35 min para hidrolizar las células, posterior las muestras fueron neutralizadas con una solución equivalente de 1 M de HCl, se agitó vigorosamente. A 0.5 mL del filtrado se le agregaron 2.5 mL de medio filtrado Lowry (19.6 g L⁻¹ de carbonato de sodio, 0.2 g L⁻¹ de citrato de sodio y 0.1 g L⁻¹ de sulfato cúprico·5H₂O) y se agitó vigorosamente. Después de 15 min, 0.25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu fue agregado y agitado vigorosamente, para ser leído pasados 25 minutos a 650 nm, su absorbancia se registró en un espectrofotómetro (Marca Camspec modelo M330). La densidad de biomasa sobre el electrodo se determinó mediante a una curva patrón que consideró peso seco y proteína de biomasa.

Microscopio electrónico de barrido

Una muestra del centro del electrodo de la CESIM de los tratamientos T4 y T6 fue pretratada mediante el siguiente procedimiento para ser vistas en microscopia electrónica de barrido (SEM) (Van Eerten-Jansen *et al.*, 2013):

Fijación de la muestra. se debe colocar el pedazo de tela de carbono y sumergirlo en 0.1 M de buffer de fosfato (pH 7.2), conteniendo 2% de formaldehído por 2 h.

Solución A: Na₂HPO₄ (0.2 M)

Solución B: NaH_2PO_4 (0.2 M)

0.1 M de buffer de fosfato (pH 7.2): Añadir 36 mL de solución A a 14 mL de solución B (0.2 M buffer de fosfato) + 50 mL de agua destilada.

2% de formaldehído. 50 mL de 0.2 M de buffer de fosfato + 10 mL de glutaraldehído al 20% (2 mL de glutaraldehído + 8 mL de agua destilada) + 40 mL de agua destilada.

Lavado. Después se lavaron los electrodos dos veces con solución 0.1 M de buffer de fosfato.

Deshidratación. Las muestras fueron deshidratadas mediante una exposición secuencial en 10, 25, 50, 75, 90 y 100% (v/v) de etanol colocando por 20 minutos en cada solución de deshidratación y 10 minutos adicionales en la solución más concentrada de etanol.

Las muestras se examinaron mediante microscopia electrónica de barrido, con el equipo Carl Zeiss Auriga 3916 – Field Emission Scanning Electron Microscopy (Jena, Alemania).

5.6. Determinación de los requerimientos energéticos (térmicos y eléctricos) para operar la celda de electrosíntesis microbiana a 37 °C durante el tiempo de operación e índices de desempeño

5.6.1. Propósito

Determinar los requerimientos energéticos tanto térmicos como eléctricos para poder analizar la viabilidad económica de la síntesis de H_2Succ por medio de CESIM.

5.6.2. Procedimientos y técnicas

Se determinaron los requerimientos energéticos eléctricos y térmicos de la CESIM mediante un balance de masa y energía considerando el tiempo y las condiciones de operación, así como las características y dimensiones de la CESIM.

La eficiencia de la CESIM será determinada según Giddings *et al* (2015) y Hernández-Correa *et al.*, 2017a). Las ecuaciones se muestran a continuación:

El rendimiento se calculó de acuerdo a la Ec. 7.

$$Y = m_{\text{H}_2\text{Succ,gen}}/m_{\text{US}} \quad [7]$$

donde $m_{\text{H}_2\text{Succ,gen}}$ es la masa de H_2Succ producida, expresada en kg o mol; m_{US} es la masa de sustrato consumido en kg o mol o sus submúltiplos g y mmol.

El Pseudorendimiento se calculó de acuerdo a la Ec. 8.

$$Y' = m_{H_2Succ,gen}/m_{IS} \quad [8]$$

donde m_{IS} es la masa inicial del sustrato en kg o mol.

El índice de la electrofermentación η_{EF} (Ec. 9), el índice de la fermentación convencional η_{fc} (Ec. 10) y así como el índice $\eta_{EF/fc}$ de Poggi-Varaldo (Ec. 11), que compara el rendimiento de la electrofermentación vs. la fermentación convencional ($\eta_{EF/fc}$) (Hernández-Correa *et al.*, 2017)

$$\eta_{EF} = m_{H_2Succ,EF}/(E_{electr} + E_{calefacción} + E_{mezclado}) \quad [9]$$

donde $m_{H_2Succ,EF}$ es la masa de H_2Succ producido en la CESIM, en kg o mol; E_{electr} significa la energía eléctrica utilizada en la fermentación, en kJ; $E_{calefacción}$ es la energía térmica requerida para elevar la temperatura de los electrolitos y el equipo, así como, la pérdida de calor, en kJ; $E_{mezclado}$ se refiere a la energía utilizada en la agitación, en kJ.

$$\eta_{fc} = m_{H_2Succ,fc}/(E_{calefacción} + E_{mezclado}) \quad [10]$$

donde $m_{H_2Succ,fc}$ es la masa de H_2Succ producido en la fermentación convencional en Kg o mol.

El $\eta_{EF/fc}$ es una variable adimensional que compara la electrofermentación en cada condición contra su control fermentación convencional y ayuda a identificar que el gasto de energía de electricidad de la electrofermentación tenga un efecto neto positivo.

$$\eta_{EF/fc} = \eta_{EF} / \eta_{fc} \quad [11]$$

La energía de eléctrica se calculó de acuerdo a la Ec. 12.

$$E_{electr} = \int P \cdot dt = \int E_{aplicada} \cdot I \cdot dt \quad [12]$$

donde P es la energía suministrada a la CESIM; I es la intensidad de corriente en la CESIM, $E_{aplicada}$ es la energía aplicada a la CESIM durante el tiempo de operación.

La energía de calefacción se calculó de acuerdo a la Ec. 13.

$$E_{calefacción} = m_{electrolitos} \cdot c_{p \text{ electrolitos}} \cdot (T_{oper} - T_{amb}) + m_{equip} \cdot c_{p \text{ equip}} \cdot (T_{oper} - T_{amb}) + U \cdot A_{equip} \cdot (T_{oper} - T_{amb}) \cdot \Delta t \quad [13]$$

donde $m_{electrolitos}$ es la masa de electrolitos en la CESIM; $c_{p \text{ electrolitos}}$ es el calor específico (presión constante) de los electrolitos; T_{oper} es la temperatura de operación, en °C o K; T_{amb} es la temperatura ambiente, típicamente 20 °C en el interior de una fábrica, en °C o K; m_{equip} es la masa del equipo, $c_{p \text{ equip}}$ es el calor específico del equipo; U es el calor total transferido del equipo por pérdida de calor del mismo; A_{equip} representa la superficie externa del equipo; Δt es el periodo de operación.

La energía de mezclado utilizada en la CESIM bajo las condiciones de operación se calculó de acuerdo con la Ec. 14.

$$E_{mezclado} = \pi * V * \Delta t \quad [14]$$

donde π es el poder volumétrico de mezclado para fermentadores/reactores de cara plana (el cual es un índice que depende de la intensidad del mezclado buscado y el tamaño del reactor); V es el volumen en el dispositivo que está siendo mezclado.

El índice de membrana se calculó de acuerdo a la Ec. 15.

$$\psi = \frac{m_{H_2Succ} (mmol) / A_{membrana} (m^2)}{\text{Costo de unidad de membrana} \left(\frac{US \$}{m^2} \right)} \quad [15]$$

donde m_{H_2Succ} es la masa de H_2Succ producida, expresada en mmol; $A_{membrana}$ significa el área de la membrana expuesta en la membrana de la CESIM en m^2 y costo de la unidad de membrana en U.S. $\$/m^2$. Por tanto, las unidades de ψ son mmol/U.S. $\$$.

Por razones que se verá en la sección 6.5., existieron diferencias de hasta dos órdenes de magnitud entre algunos valores del índice ψ por lo que se decidió utilizar transformación logarítmica de ψ , *i.e.* $\ln(\psi)$, para los ulteriores cálculos estadísticos.

El índice ω , señala la relación entre el H_2Succ producido y los compuestos concomitantes, donde una ω alta expresa que el sustrato se utilizó para la síntesis de H_2Succ , mientras que una baja ω significa que el sustrato fue utilizado más hacia la producción de ácidos concomitantes que para H_2Succ (Ec. 16).

$$\omega = \frac{m_{H_2Succ}}{m_{\text{ácido acético}} + m_{\text{ácido fórmico}}} \quad [16]$$

donde m_{H_2Succ} es la masa de H_2Succ producida, expresada en kg o mol; $m_{\text{ácido acético}}$ representa la masa de ácido acético producida, expresada en kg o mol; y $m_{\text{ácido fórmico}}$ significa la masa de ácido fórmico producido, expresada en kg o mol.

Se realizó un ANOVA y una prueba Duncan cuando hubo diferencias significativas.

6. Resultados y discusión

6.1. Evaluación del pretratamiento ácido diluido de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos y evaluación del cascarón de huevo en polvo como adsorbente de compuestos inhibidores formados durante el pretratamiento ácido diluido

6.1.1. Evaluación de pretratamiento ácido diluido de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos para la obtención de azúcares reductores

Los resultados de esta sección se muestran de la Tabla 14 a la 19, en la Figura 8 y el Anexo 2. En el Anexo 5 están los cromatogramas de azúcares reductores y de compuestos tóxicos del hidrolizado.

La FORSU está principalmente compuesta por hemicelulosa y celulosa en 48.5 y 45% (p/p), respectivamente, estos resultados concuerdan con lo reportado anteriormente por el mismo grupo de trabajo (Escamilla-Alvarado, 2009). La CRA fue cercana a 8 L de agua por kg de FORSU (Tabla 14), con base en la CRA se estableció una relación entre la FORSU y el ácido diluido de 1:10 (p/v) para llevar a cabo una hidrólisis homogénea del sustrato.

Tabla 14. Caracterización de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos antes y después de ser tratada con H₂SO₄ al 4% por 17 min a 121 °C a 15 psi

Parámetro	FORSU	Residuo de FORSU Hidrolizado
Celulosa (%)	45.035±2.1	34.79±3.91
Hemicelulosa (%)	48.5±0.5	23.3±0.9
Lignina (%)	6.55±3.1	11.1±0.74
Cenizas (%)	0.002	0.003
CRA (L kg ⁻¹) ^a	7.69±0.22	No determinado

^aCRA: Capacidad de retención de agua

Se utilizó un diseño factorial con cinco puntos centrales para identificar la importancia de la concentración de ácido sulfúrico y el tiempo de hidrólisis con relación a la liberación de azúcares reductores de la FORSU (Tabla 15), derivado de los resultados de este experimento se obtuvo la Ec. 17. El efecto fue determinado utilizando una prueba de ANOVA (Tabla 16). La tabla del ANOVA se encuentra en el Anexo 6.

Tabla 15. Diseño factorial con cinco puntos centrales (valores codificados y reales) con la cantidad de azúcares reductores obtenidos como respuesta

Tratamiento	Valores codificados		Valores reales		
	H ₂ SO ₄	Tiempo	H ₂ SO ₄ (%)	Tiempo (min)	AR (gL ⁻¹)
1	-1	-1	1	10	14.4 ± 0.7
2	1	-1	3	10	22.6 ± 0.5
3	-1	1	1	20	15.5 ± 1.1
4	1	1	3	20	25.4 ± 2.6
5	0	0	2	15	20.2 ± 3.0

AR: Azúcares reductores.

Tabla 16. Obtención de azúcares reductores basados en los resultados del diseño factorial 2² con cinco puntos centrales

Variables	Coefficiente estimado	Error estándar	F	p(F)
Intercepción en el origen b ₀	19.70	0.49	31.5	6.5E-06
H ₂ SO ₄ b ₁	4.53	0.58	60.3	1.9E-06
Tiempo b ₂	0.97	0.58	2.8	0.11733486

Coefficiente de determinación (R²): 0.82; R² ajustada: 0.79; Coeficiente de variación: 10.26%; Falta de ajuste (valor de P): 0.5213. F: Valor estadístico de Fisher; p(F): Probabilidad valor del estadístico de Fisher.

$$AR = 19.70 + 4.53 \times \text{ácido sulfúrico (\%)} + 0.97 \times \text{tiempo(min)} \quad [17]$$

Con base en el modelo obtenido del factorial 2² con cinco puntos centrales (Ec. 13), se empleó el paso de ascenso para acercarse a un punto vecino al óptimo, incrementando la concentración de H₂SO₄ y el tiempo con el objetivo de llegar al valor más alto posible de AR obtenidos. Se partió de los coeficientes del ácido sulfúrico (4.53) y el tiempo (0.97), los cuales fueron normalizados y equivalentes a 1 y 0.2. Entonces las concentraciones evaluadas de H₂SO₄ fueron incrementando en el orden de 1 unidad, mientras que el tiempo fue incrementando en 0.2. El punto central utilizado en el diseño factorial se utilizó como el origen de la ruta. El diseño y la concentración de AR obtenida en el paso de ascenso de cada corrida se muestran en la Tabla 17.

Partiendo desde el punto central se registró un aumento del 12.1% en la liberación de AR por cada incremento en el nivel (Tabla 17). Se obtuvieron 28.3 g L⁻¹ de AR en la corrida 3. Después de 5% de H₂SO₄ durante 18 min, la liberación de AR va en decaimiento (corrida 4, Tabla 17), por lo cual el punto más cercano al óptimo fue cuando se aplicó el tratamiento con 4% de H₂SO₄ durante 17 min (corrida 3, Tabla 17). Alrededor de este punto sería recomendable realizar una superficie de respuesta (Montgomery, 2009), pero no se realizó en este trabajo porque la concentración de AR se consideró particularmente atractiva.

Tabla 17. Diseño experimental y resultados del paso de ascenso

Corrida	H ₂ SO ₄ (%)	Tiempo (min)	AR (g L ⁻¹)
1	2	15	22.8±3.0
2	3	16	26.6±0.3
3	4	17	28.3±0.1
4	5	18	27.0±0.1
5	6	19	23.1±0.3

AR: azúcares reductores.

Como se mencionó anteriormente Ghanavati *et al.* (2015) llevaron a cabo la hidrólisis FORSU con un PAD (3% de H₂SO₄ por 45 min a 121 °C) resultando en la liberación de 65.5 g L⁻¹ de azúcares el doble de la cantidad de azúcares obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, al analizar los rendimientos g AR/g FORSU, éstos fueron similares (0.32 vs 0.28) a los del presente trabajo. El hecho que se haya obtenido poco menos de la mitad de azúcares puede ser debido a una serie de factores como la composición de la FORSU utilizada, la relación carga de FORSU/volumen de ácido diluido que en el primer caso fue 1:5, mientras que en nuestra investigación fue de 1:10, es decir diluida por doble vez.

Con la finalidad de incrementar la cantidad de AR se disminuyó la relación FORSU:H₂SO₄ al 4% en dirección 1:5 pero no se encontró un mejor resultado (corrida 5; Tabla 18) debido a que la FORSU no estuvo en completo contacto con el ácido diluido y al aumentar el tiempo de hidrólisis a 30 o 40 min, tampoco se obtuvo un resultado favorable.

Tabla 18. Relación FORSU:ácido diluido y tiempo

Núm. de corrida	Relación FORSU:ácido diluido 4% (p/v)	Tiempo (minutos)	Azúcares reductores (g L ⁻¹)
1	(1:10)	17	28.3±2.7
2	(1:10)	30	20.8±6.95
3	(1:10)	40	22.3±1.98
4	(1:7)	17	18.1±1.5
5	(1:5)	17	Nd

Notas: Nd: No determinado

Una vez que se obtuvo un hidrolizado de FORSU rico en azúcares en este trabajo, se procedió a la destoxificación del mismo con carbón activado al 2% a 150 rpm durante 30 min. La composición de azúcares reductores presentes en el hidrolizado se muestran en la figura 8. De los azúcares obtenidos 58% fue xilosa y el 42% fue glucosa. El hidrolizado destoxificado obtenido se utilizó como fuente de carbono para las actividades 4, 5 y 6 y su caracterización se muestra en la Tabla 19.

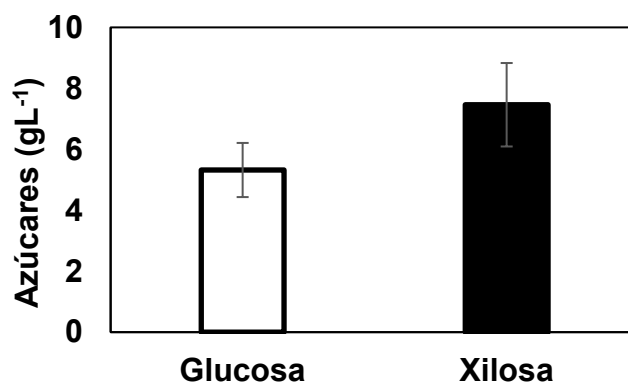


Figura 8. Azúcares presentes en hidrolizado destoxificado con carbón activado al 2% cuantificado por HPLC-RID.

Tabla 19. Características del hidrolizado no destoxificado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos

Parámetro	Valor
pH	0.5±0.018
Azúcares reductores (g L ⁻¹)	28.3±0.07
Contenido de fenoles totales (g L ⁻¹ de ácido gálico equivalentes)	0.43±0.05
Contenido de fenoles totales (g L ⁻¹ de ácido siríngico equivalentes)	1.36±0.04
Furfural (g L ⁻¹)	0.69±0.05
HMF (g L ⁻¹) ^a	2.60±0.37
Ácido levulínico (g L ⁻¹)	2.80±0.38

Notas: ^aHMF: 5-(hidroximetil)furfural

6.1.2. Destoxificación del hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos cascarón de huevo en polvo

Los resultados de esta sección se encuentran en las Tablas 20 a la 23. Las figuras 9 a la 20.

6.1.2.1. Destoxificación por sobre-adición de Ca(OH)₂

La hidrólisis ácida de la FORSU o de otro material lignocelulósico es una estrategia efectiva y rápida para la liberación de azúcares, sin embargo, existe la formación de compuestos inhibidores (Martínez *et al.*, 2001; Silva & Bertucco, 2017).

Se ha propuesto la sobre adición de cal como un pretratamiento para destoxificar hidrolizados (Martínez *et al.*, 2001). En el presente trabajo se evaluó la destoxificación por sobre-adición de cal, y ajuste de pH del hidrolizado (Fig. 9 y 10). Se encontró una remoción de compuestos fenólicos cercana al 20%. A pH 3 y 6 se observó una remoción de los compuestos fenólicos entre el 5 y 10% (Fig. 9). Se ha documentado que la neutralización del hidrolizado es suficiente para ocasionar una disminución en la concentración de inhibidores (Martínez *et al.*, 2001).

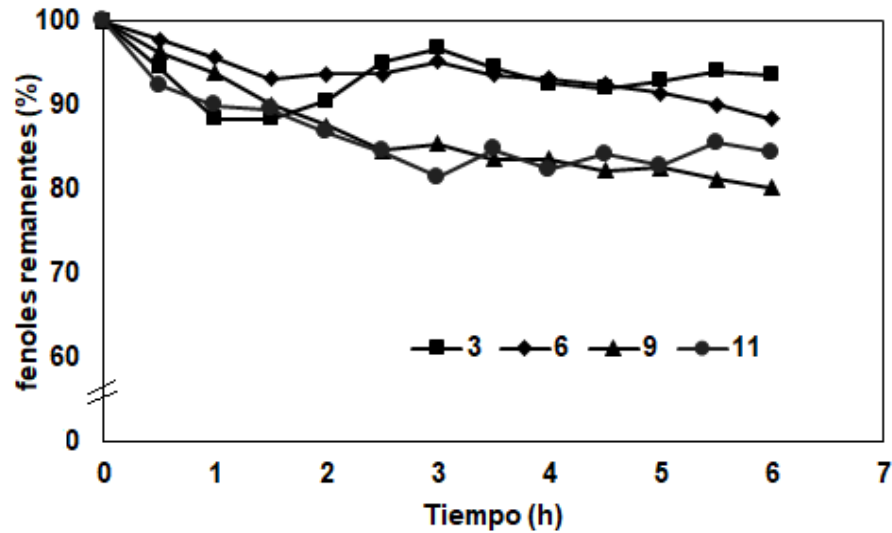


Figura 9. Compuestos fenólicos remanentes en hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos tratados con sobre-adición de Ca(OH)_2 a pH 3, 6, 9 y 11.

En la figura 10 se puede observar el efecto de la sobre-adición de Ca(OH)_2 , cuando el hidrolizado se mantuvo a pH 9 y 11 se registró una pérdida del 20% de azúcares reductores, desde la primera hora y esta pérdida alcanzó el 30% a las 4h, siendo más severa la pérdida en el tratamiento a pH 11. Es importante mencionar que emplear Ca(OH)_2 es una estrategia económica, no obstante, se genera un residuo de Ca(OH)_2 que contiene los compuestos inhibidores precipitados, además de las pérdidas de AR.

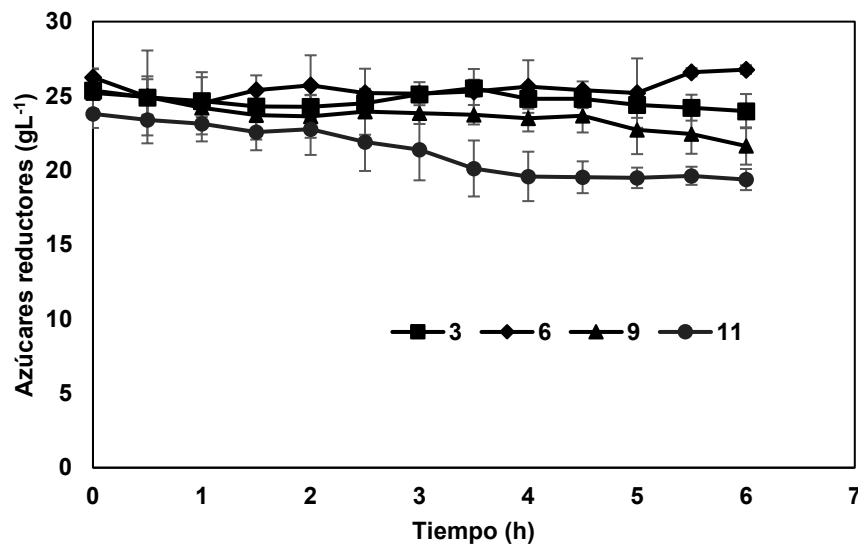


Figura 10. Azúcares reductores remanentes en hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos tratados con sobre-adición de Ca(OH)_2 a pH 3, 6, 9 y 11.

Debido a la baja remoción de compuestos fenólicos y a la pérdida de AR ocasionados por la sobre-adición de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, se decidió evaluar el CHP como adsorbente de compuestos inhibidores en el hidrolizado de FORSU.

6.1.2.2. Características del cascarón de huevo en polvo

Las características del CHP se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Propiedades físicas y químicas del cascarón de huevo en polvo

Propiedad	Valor
Densidad real (g cm^{-3}) ^a	2.5
Capacidad de intercambio catiónico (meq/100 g) ^a	9.5
Volumen total del poro ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) ^b	6.5×10^{-3}
Porosidad de partícula ^b	1.6×10^{-2}
CaCO_3 (%) ^c	95
Área superficial BET ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) ^e	0.2 ^f
	0.67 ^g
	6.93 ^h
pH (H_2O) ^d	8.7
Tamaño de partícula (μm)	<250

Notas: ^a Tomado de Freire & Holanda (2006); ^b Tsai *et al.* (2006); ^c Zulfukar *et al.* (2012); ^d Datos propios. pH en agua destilada 20% (p/v). ^e Hernández-Correa *et al.* (2017b) BET: Brunauer, Emmett & Teller. Para la determinación del área superficial se registraron los siguientes valores dependientes de las condiciones del proceso de desgasificación: ^f 423 K durante 16 h; ^g 523 K durante 16 h; ^h 523 K durante 16 h + molido adicional con mortero y pistilo.

Respecto al tamaño de partícula, el CHP se tamizó por una malla núm. 60, por lo que se esperaba encontrar partículas de un tamaño $\leq 250 \mu\text{m}$. Las micrografías de SEM revelaron una longitud de partícula promedio de $43.9 \pm 40.2 \mu\text{m}$, sin embargo, después de que se realizó la adsorción el tamaño fue más homogéneo $76.2 \pm 31.3 \mu\text{m}$; este cambio en la longitud de partícula fue estadísticamente significativo ($p < 0.01$; ANOVA en Anexo 6). Lo anterior podría ser explicado debido a que las partículas más pequeñas compuestas de carbonato de calcio, probablemente se disolvieron durante el tratamiento a pH 3 (Fig. 13A-13D); se observó que antes de la adsorción se encontraban partículas de tamaño más pequeño (Tabla 21). El análisis de difracción de rayos X, reveló una menor intensidad en los picos correspondientes a CaCO_3 al

término de la adsorción (Fig. 11). Las Figuras 13E y 13F muestran la composición de la membrana de cascarón de huevo y la morfología de las subestructuras del CHP.

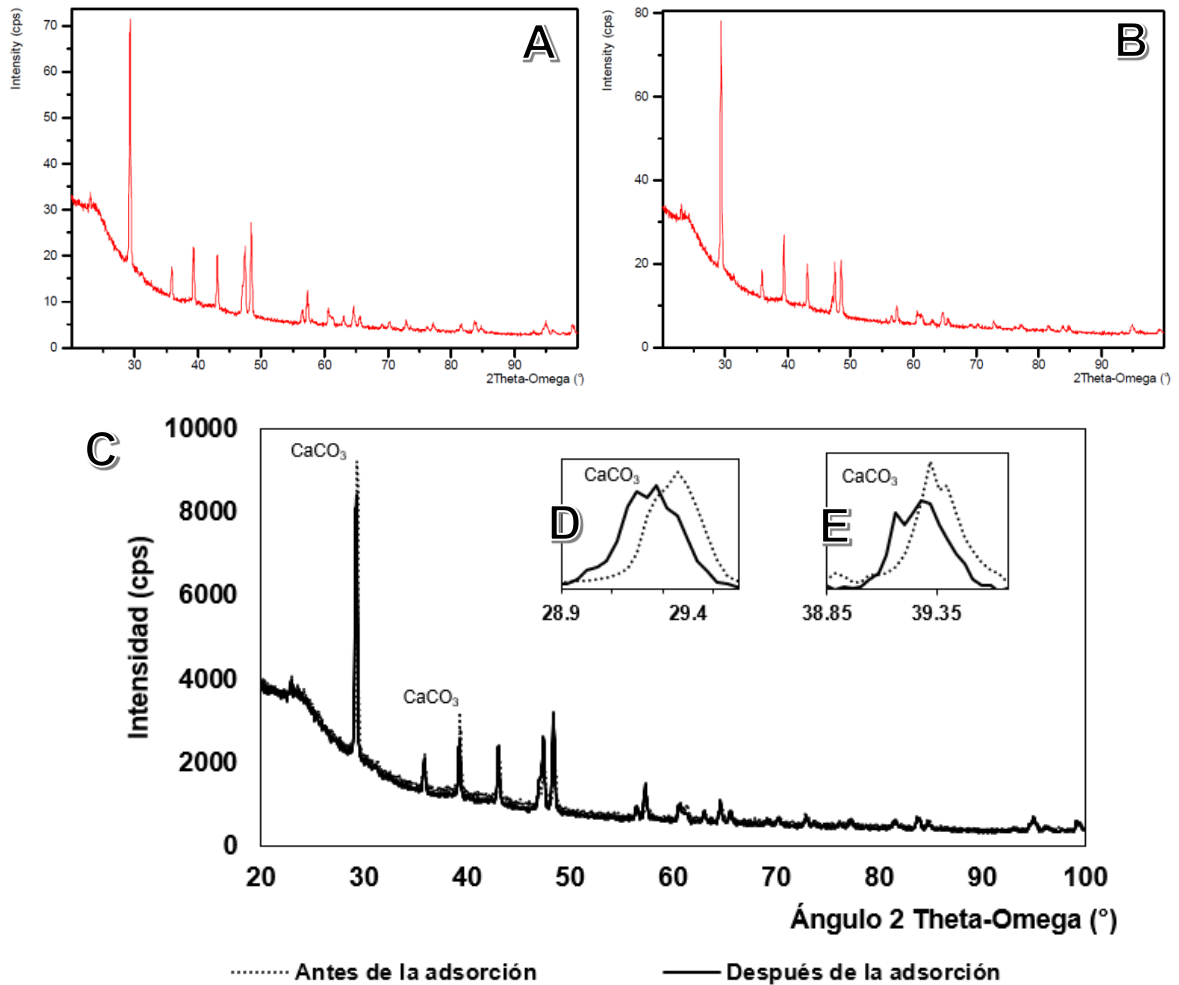


Figura 11. Patrón de difracción de rayos X de cascarón de huevo en polvo. (A) Antes de la adsorción; (B) Después de la adsorción (C) Superposición antes y después de la adsorción; (D) recuadro que muestra la diferencia en la intensidad de adsorción en el ángulo 29°, antes y después de la adsorción (E) *ídem* en el ángulo 39.3°.

6.1.2.3. Tamaño de partícula del cascarón de huevo en polvo

Tabla 21. Moda, mediana, valor mínimo y máximo y promedio del tamaño de partícula de cascarón de huevo antes y después de la adsorción

	Moda (μm)	Mediana (μm)	Min (μm)	Max (μm)	Promedio (μm)
Antes de la adsorción	6.4	30.7	1.7	198.3	43.9 \pm 40.2
Después de la adsorción	37.6	74.1	24.5	178.2	76.2 \pm 31.3

6.1.2.4. Diámetro del poro del cascarón de huevo en polvo

El diámetro del poro del CHP antes y después del tratamiento de adsorción fue de 307 \pm 43.8 nm y 305.8 \pm 47.7 nm, respectivamente, el ANOVA no mostró diferencias significativas. Como se observa la distribución de los poros sobre el material no presenta uniformidad (Fig. 12).

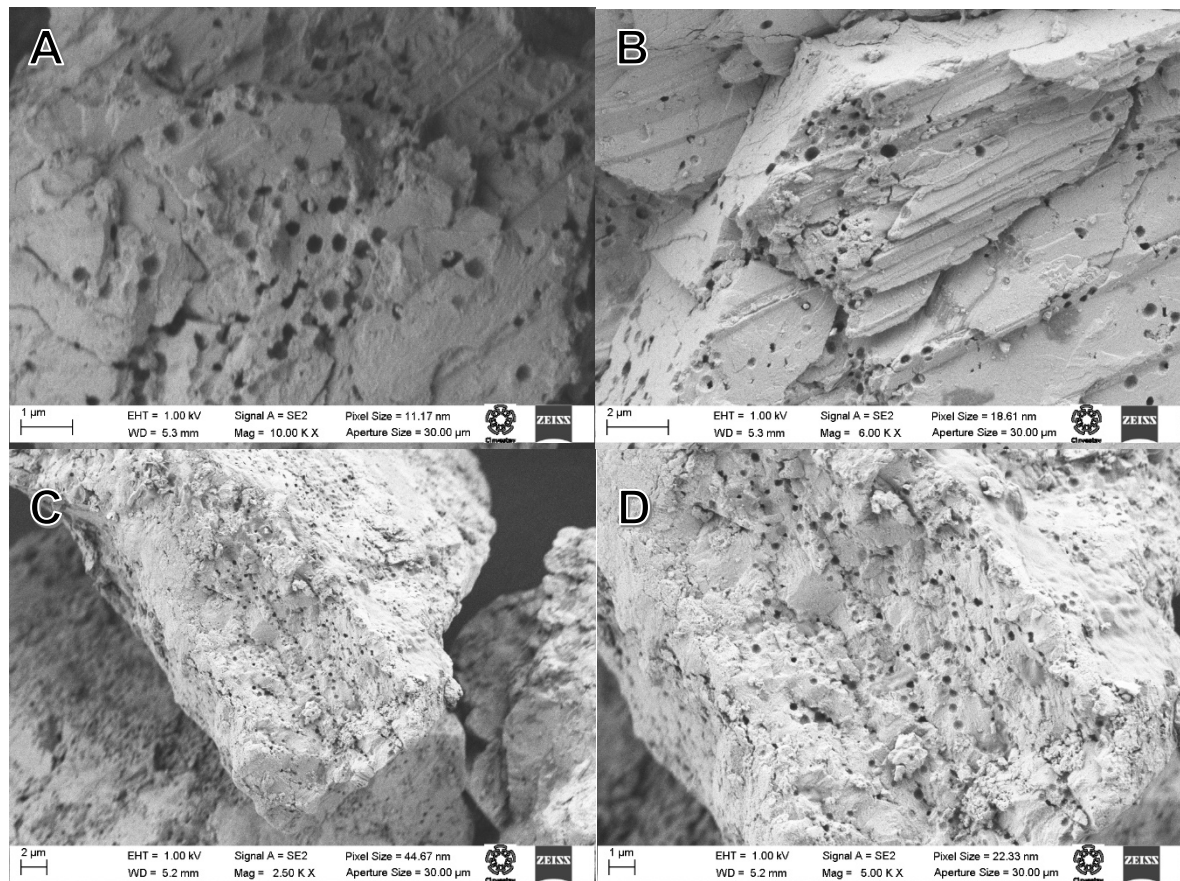


Figura 12. Micrografías de microscopía electrónica de barrido ilustrando los poros del cascarón de huevo en polvo (A) Partículas de cascarón de huevo en polvo antes de la adsorción; (B) Partículas de cascarón de huevo en polvo después de la adsorción (C) No uniformidad de los poros en partícula de cascarón de huevo en polvo; (D) Aproximación a No uniformidad de los poros en partícula de cascarón de huevo en polvo. Escala de las barras: A= 1 μm ; B= 2 μm ; C= 2 μm & D= 1 μm .

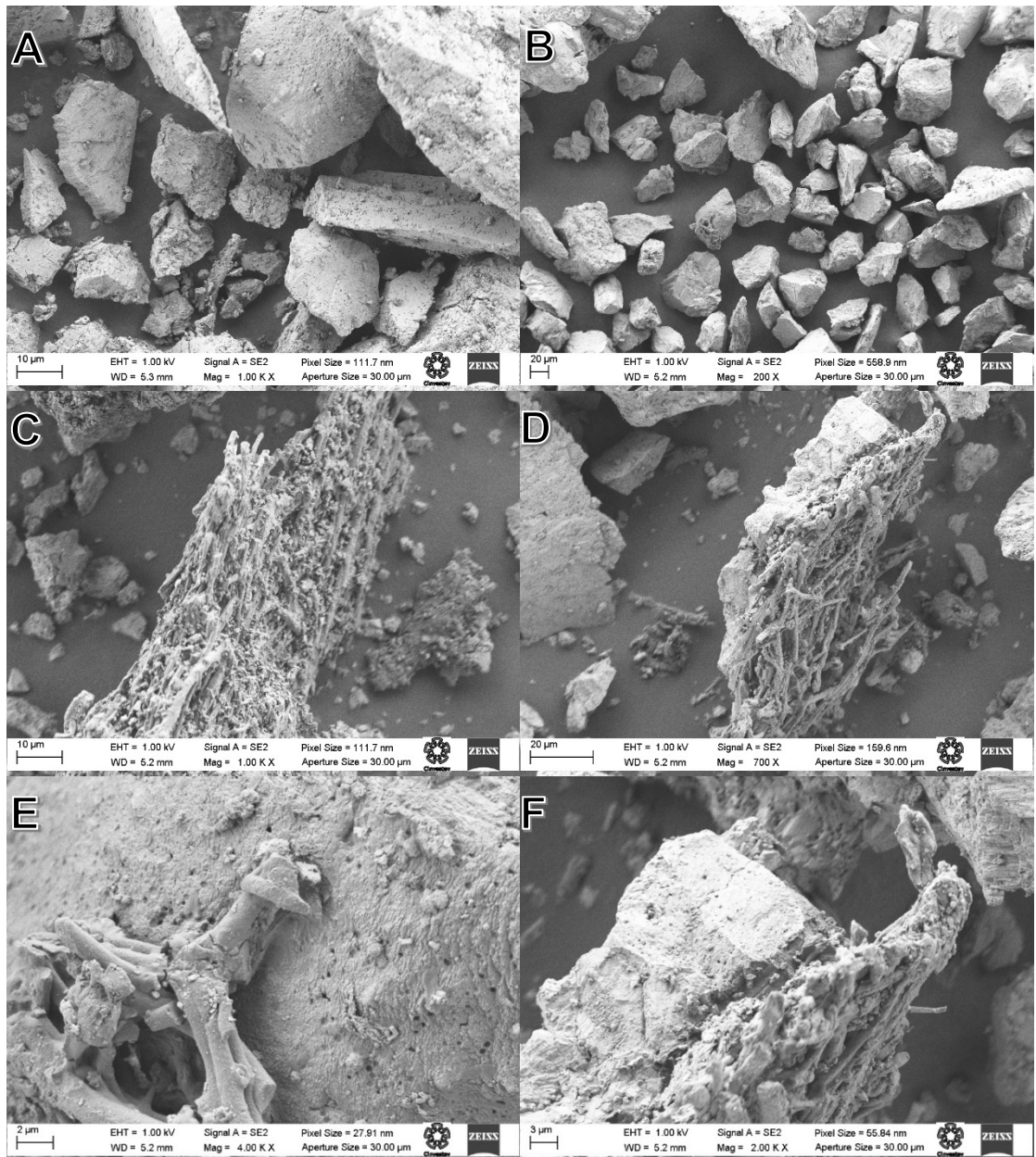


Figura 13. Micrografías de microscopía electrónica de barrido ilustrando las partículas y capas del cascarón de huevo en polvo. (A) Partículas de cascarón de huevo en polvo antes de la adsorción; (B) Partículas de cascarón de huevo en polvo después de la adsorción (C) Membrana de cascarón de huevo en polvo antes de la adsorción; (D) Diferentes capas del cascarón de huevo antes de la adsorción; (E) Punto de unión entre la membrana del cascarón de huevo y las capas de carbonato después de la adsorción (F) Aproximación a las diferentes capas del cascarón de huevo antes de la adsorción. Escala de las barras: A= 10 μm ; B= 20 μm ; C= 10 μm ; D= 20 μm ; E= 2 μm & F= 3 μm .

6.1.2.5. Experimentos de adsorción con cascarón de huevo en polvo

El CHP es un material que ha sido utilizado en múltiples aplicaciones, por ejemplo como mejorador de suelos ácidos, como precursor de VPA (hidroxiapatita) y ha resultado efectivo como adsorbente de una amplia gama de contaminantes (Ingole *et al.*, 2017; De Angelis *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Quina *et al.*, 2017).

6.1.2.6. Cinéticas de adsorción de compuestos fenólicos por el cascarón de huevo en polvo

Cuando se realizó la cinética de adsorción de compuestos fenólicos con CHP a pH 3, 6, 9 y 11, se encontró que la mayor adsorción de estos compuestos ocurre a pH ácidos. Incluso a pH 11 no hay una adsorción significativa con respecto al grupo control sin CHP. La mayor remoción de compuestos fenólicos se presentó cuando se ajustó el hidrolizado a pH 9 con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y agregando 6% de CHP, en donde se registró una remoción hasta del 30% de los compuestos fenólicos (Fig. 14). No se observó una remoción neta de azúcares debida al CHP (Fig. 15). Adicional, el CHP neutraliza el pH del hidrolizado a pH 3, llevándolo a un pH más cercano al pH requerido para la fermentación (Fig. 16).

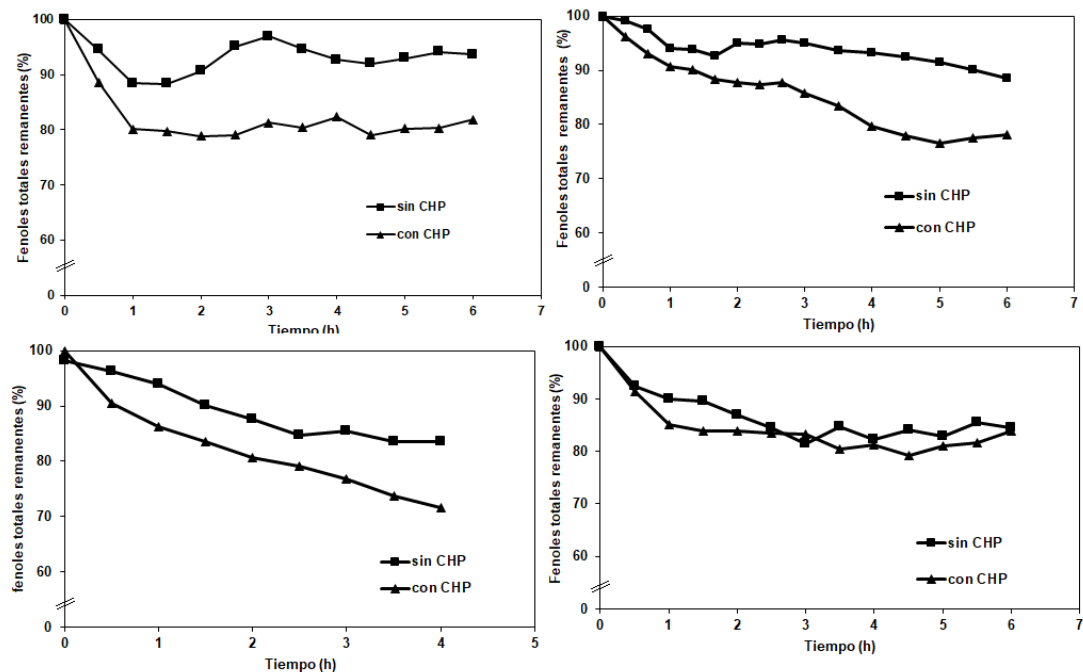


Figura 14. Cinética de adsorción de fenoles totales remanentes en hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos, con cascarón de huevo al 6% (p/v) y ajuste de pH 3, 6, 9 y 11 (A, B, C y D, respectivamente; CHP: cascarón de huevo en polvo).

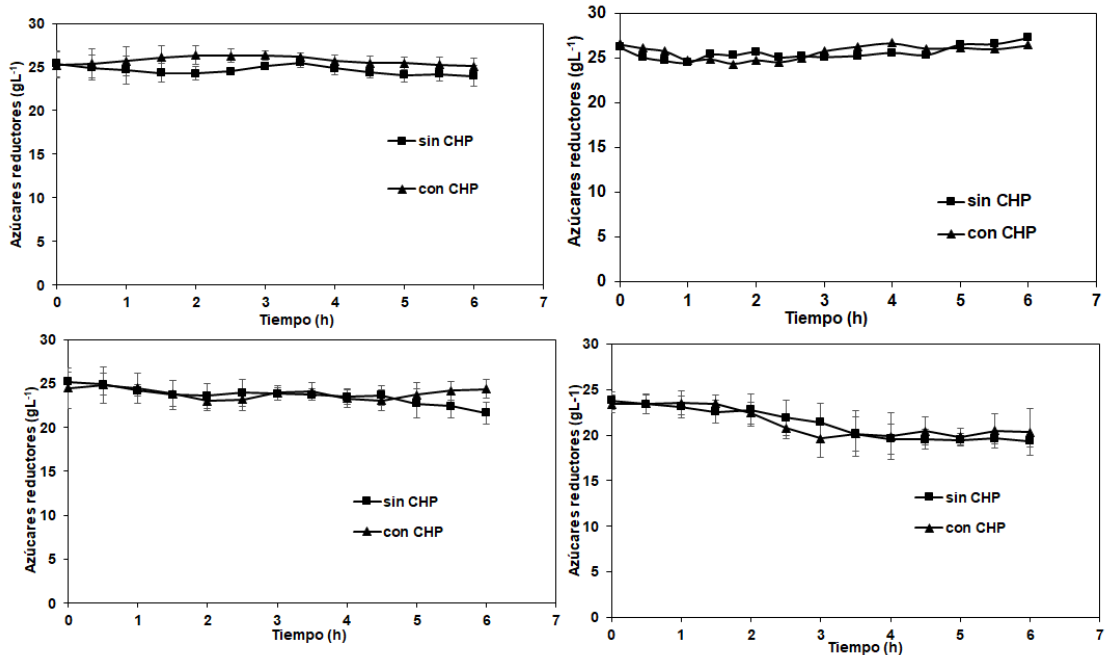


Figura 15. Cinética de adsorción de azúcares reductores remanentes en hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos con cascarón de huevo en polvo al 6% (p/v) ajustado a pH 3, 6, 9 y 11 (A, B, C y D, respectivamente; CHP: cascarón de huevo en polvo).

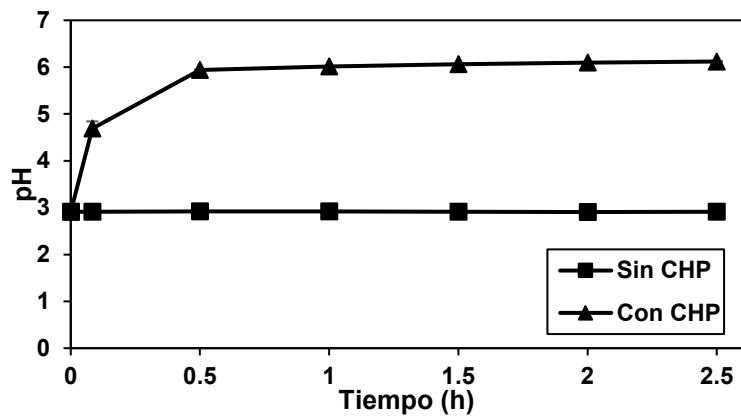


Figura 16. Comportamiento del pH debido a la presencia de cascarón de huevo en polvo en hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos

6.2.1. Análisis de los datos de las cinéticas de adsorción de compuestos fenólicos por el cascarón de huevo en polvo

La adsorción de compuestos fenólicos debida al CHP, se ajusta mejor a un modelo de segundo orden, para todos los casos evaluados a diferente pH (Fig. 17). La q_{exp} fue de 3 mg g^{-1} de CHP a pH 3 y 6 y en el caso de pH 11 fue de 2 mg g^{-1} de CHP (Tabla 22). No se muestran datos a pH 11 debido a que la adsorción de compuestos fenólicos en

CHP no fue significativa con respecto al grupo control (pH 11 y sin CHP). Daraei *et al.* (2013) pusieron a prueba la adsorción de fenol sobre CHP. En contraste a Daraei *et al.* (2013) les ajusta mejor el modelo de primer orden. Cuando se analiza la k_1 , en el presente trabajo se obtuvo el doble del valor de k_1 reportado por Daraei *et al.* (2013) para pH 9, a pesar de que la concentración de CHP en sus experimentos fue casi el triple.

6.1.2.8. Remoción de ácido levulínico y HMF presentes en hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos por cascarón de huevo en polvo

Con respecto a la presencia de otros inhibidores como el ácido levulínico y el HMF, se pudo observar que a diferencia de los compuestos fenólicos, la máxima adsorción debida al CHP se registró a pH alcalinos (Fig. 17 y 18). Sin embargo, la concentración de ácido levulínico y de HMF se ven reducidas a pH alcalinos entre un 25 y 70%, debido a la sobre-adición de cal y no por la adsorción en CHP.

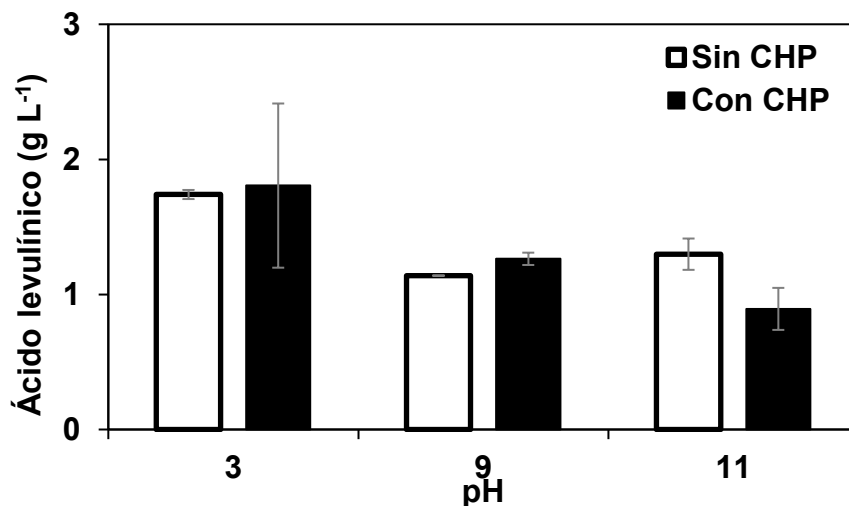


Figura 17. Ácido levulínico remanente de los tratamientos a pH 3, 9 y 11 a las 4 h de tiempo de contacto con y sin cascarón de huevo en polvo.

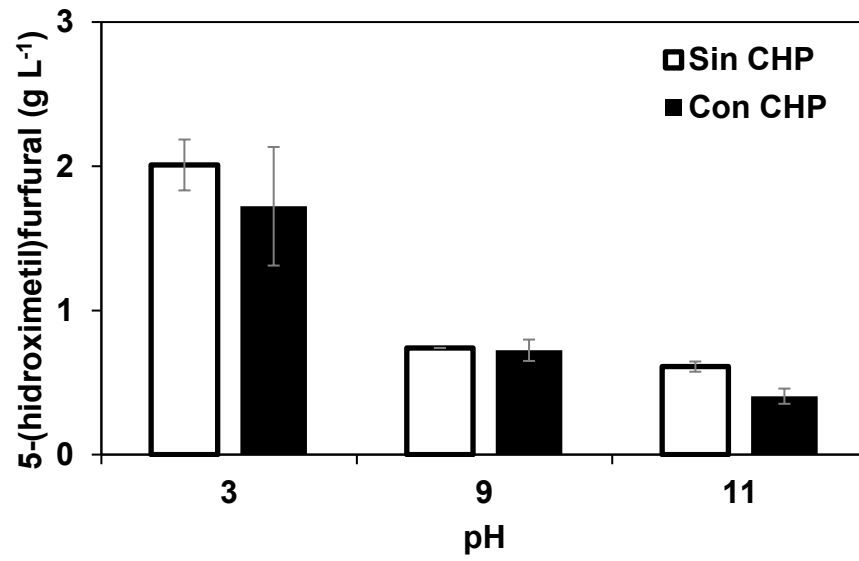


Figura 18. 5-(hidroximetil)furfural remanente de los tratamientos a pH 3, 9 y 11 a las 4 h de tiempo de contacto con y sin cascarón de huevo en polvo

Tabla 22. Parámetros de modelos cinéticos de la adsorción de compuestos fenólicos sobre cascarón de huevo en polvo a pH 3, 6 y 9.

pH	Modelo	R ² ^a	p(F) ^b	gl ^c	q _{exp} ^d (g _{fen} g _{CHP} ⁻¹)	q _{pred} ^e (g _{fen} g _{CHP} ⁻¹)	k ₁ ^f (h ⁻¹)	k ₂ ^g (g _{CHP} g _{fen} ⁻¹ h ⁻¹)
3	1er orden	0.4580	0.2096	4	0.0033	0.0024	0.5225	NA ^{h>}
3	2do orden	0.7836	0.115	3	0.0033	0.0026	NA	1450.6
6	1er orden	0.7371	0.006	7	0.0033	0.0027	0.1711	NA
6	2do orden	0.9532	0.0003	6	0.0033	0.0018	NA	1197.5
9	1er orden	0.6512	0.099	4	0.0020	0.0025	1.0816	NA
9	2do orden	0.8444	0.027	4	0.0020	0.0017	NA	5151.5

^a R²: Coeficiente de determinación; ^b p(F): Probabilidad valor del estadístico de Fisher de la regresión de la cinética linearizada; ^c gl: Grados de libertad; ^d q_{exp}: Cantidad experimental de compuestos fenólicos adsorbidos (en equivalente ácido gálico????) por unidad de masa de adsorbente en equilibrio; ^e q_{pred}: Valor predicho por el modelo cinético ajustado de la cantidad de compuestos fenólicos adsorbidos por unidad de masa de adsorbente en equilibrio; ^f k₁: Constante cinética de primer orden; ^g k₂: Constante cinética de modelo de segundo orden; ^h no aplicable

6.1.2.9. Parámetros de isothermas de adsorción de compuestos fenólicos presentes en hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos

Las ecuaciones 18 al 23 muestran los modelos teóricos, los modelos ajustados, y las formas linealizadas usadas para las regresiones del modelo lineal y del modelo de Freundlich de isoterma.

La Fig. 19 muestra el ajuste visual de los modelos de isoterma lineal y de Freundlich de los datos experimentales. La Tabla 23 exhibe los parámetros de los modelos ajustados y parámetros de bondad de ajuste a saber, la norma calculada con q predichas (q_{pred}) y q experimentales (q_{exp}), el coeficiente de determinación de las regresiones efectuadas y la probabilidad del estadígrafo F de las regresiones. En el caso de la isoterma de Freundlich la regresión se efectuó con las variables transformadas $\ln q$ y $\ln C$. Por tanto, R^2 y $p(F)$ de la regresión del modelo de Freundlich deben tomarse con cautela porque son parámetros de la regresión con datos transformados Ec. 17.

Usando la norma como criterio para el ajuste de los modelos, se observa que el modelo lineal ajusta mejor (0.0185) y tiene menores errores en los parámetros de la isoterma (Tabla 23).

$$q = k_l C \quad (18)$$

$$q = k_F C^{\frac{1}{n}} \quad (19)$$

$$q = k_l C \quad (20)$$

$$\ln q = \ln k_F + \frac{1}{n} \ln C \quad (21)$$

$$q = 4.55 \times 10^{-3} C \quad (22)$$

$$q = 1.804 \times 10^{-3} C^{\frac{1}{0.8327}} \quad (23)$$

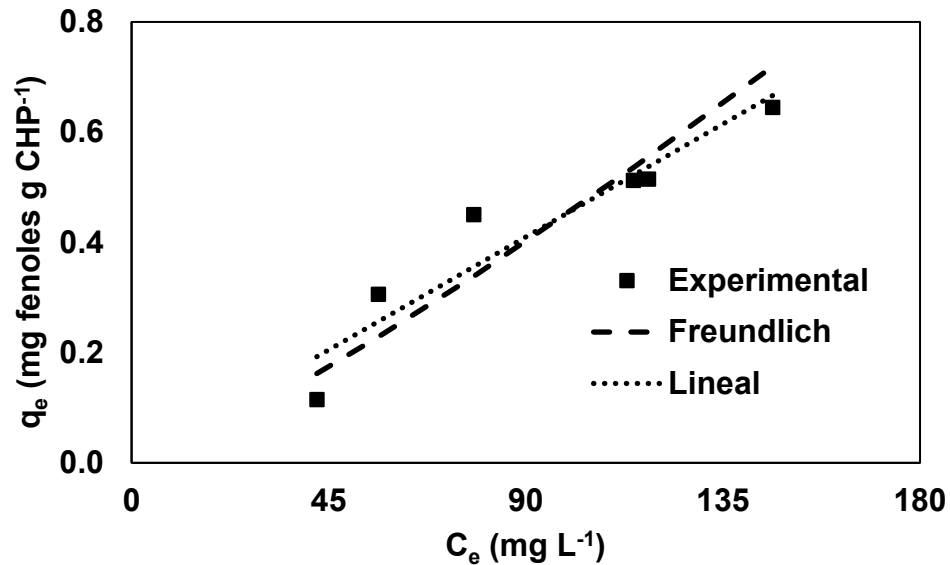


Figura 19. Isoterma de adsorción de compuestos fenólicos sobre cascarón de huevo en polvo (6%), pH 3, temperatura ambiente (25 °C), 300 rpm durante 24 h.

Tabla 23. Parámetros de isoterma de adsorción de compuestos fenólicos sobre cascarón de huevo en polvo.

Isoterma	k_l^a (L g ⁻¹)	k_F^b (L ^{-1.201} mg ^{-0.201} g ⁻¹)	n^c	Norma (mg ² g ⁻²) ^d	R ^{2e}	p(F) ^f
Lineal	4.55x10 ⁻³ ±0.025x10 ⁻³	NA	NA	0.0185	0.985	9.01x10 ⁻⁶
Freundlich	NA	1.804x10 ⁻³ ±1.23x10 ⁻³	0.8327 ±0.1867	0.0284	0.852 ^g	9.50x10 ^{-3g}

NA: No aplica; ^a Coeficiente de isoterma lineal; ^b Coeficiente de isoterma Freundlich; ^c Parámetro de intensidad Freundlich; ^d La norma se calculó como $\sum(q_{Pred} - q_{Exp})^2$; ^e Coeficiente de determinación; ^f Probabilidad del estadígrafo de Fisher de la regresión lineal correspondiente; ^g Calculado para la regresión lineal de variables transformadas $\ln q$ y $\ln C$.

Se definió una variable conveniente λ que describe la razón de carga adsorbente/adsorbato (masas iniciales). En el presente ensayo la λ fue de 0.42 g_{CHP} mg_{ácido gálico equivalente}⁻¹, mientras que Daraei *et al.* (2013) realizaron sus ensayos de adsorción con una λ excesiva, 18 veces superior a la trabajada en el presente reporte. A mayor λ , menor es la sustentabilidad del proceso.

6.2. Diseño y construcción de una celda de electrosíntesis microbiana para la producción de ácido succínico

La CESIM se construyó a partir de acrílico de 1 pulgada de espesor y las características fueron basadas en la experiencia del equipo de trabajo. Para mantener las condiciones de asepsia requeridas para la electrofermentación, se sumergieron las cámaras de la CESIM en una solución de hipoclorito de sodio al 5.6% (v/v) por 4 h.

Se escogió la configuración de reactor electroquímico “cara plana” para la CESIM por la facilidad para colocar la membrana y poder pasar de una configuración de dos cámaras a tres cámaras (Gildemyn *et al.*, 2015). La agitación orbital (180 rpm) no fue efectiva, debido a que se observaron depósitos principalmente de $MgCO_3$ en la base de la CESIM durante toda la fermentación.

La fuente de potencia fue un diseño apropiado construido a partir de materiales de desecho. En otros trabajos se ha recurrido al uso de potencióstatos los cuales superan un costo de U.S. \$ 1200. Se resolvió el suministro de corriente eléctrica con 0.25% del costo de otros potencióstatos y utilizando materiales de desecho. (<https://www.alibaba.com/showroom/potentiostat.html>, consultada en enero, 2018).

6.3. Aislamiento e identificación de un organismo productor de ácido succínico a partir de rumen de caprino

Los resultados de la presente sección se encuentran distribuidos en las Tablas 24 y 25 y las Figuras 20 a la 25.

Se seleccionaron 16 colonias que crecieron en presencia de los antibióticos lasalocid y monensina, dichas colonias crecieron durante 24 h en medio líquido. El medio fermentado se analizó en HPLC-RID, y de las 16 colonias fermentadoras, se encontró que el 65% registró producción de H_2Succ (Tabla 24). Se seleccionó la cepa “*Caprina EHC*”, ya que fue la mayor productora de H_2Succ (1.46 g L^{-1}), bajo las condiciones evaluadas. Los cromatogramas correspondientes a la *Caprina EHC* y *Caprina 8* se muestran en la figura 23. Las cepas 1, 5, 7, 11, 12, 13 y 14 presentaron una producción de H_2Succ por debajo del límite de detección. *Caprina EHC* es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, con forma de bacilo (Figura 21).

Tabla 24. Producción de ácido succínico por cepas aisladas a partir de rumen de caprino después de 24 h de fermentación.

Cepa	Concentración de H ₂ Succ ^b (g L ⁻¹)	Cepa	Concentración de H ₂ Succ ^b (g L ⁻¹)
<i>Caprina 1</i>	nd ^a	<i>Caprina 9</i>	0.84
<i>Caprina 2</i>	0.88	<i>Caprina 10</i>	0.66
<i>Caprina EHC</i>	1.46	<i>Caprina 11</i>	nd ^a
<i>Caprina 4</i>	0.76	<i>Caprina 12</i>	nd ^a
<i>Caprina 5</i>	nd ^a	<i>Caprina 13</i>	nd ^a
<i>Caprina 6</i>	0.92	<i>Caprina 14</i>	nd ^a
<i>Caprina 7</i>	nd ^a	<i>Caprina 15</i>	0.66
<i>Caprina 8</i>	1.08	<i>Caprina 16</i>	0.62

^a nd: No detectado, ^b H₂Succ: ácido succínico

El análisis molecular de la secuencia del fragmento ribosomal 16s del producto de PCR de la cepa aislada *Caprina EHC* (Fig. 20), reveló un total de 1459 nucleótidos de la secuencia del fragmento de la subunidad ribosomal del 16s; de acuerdo a la búsqueda BLAST del NCBI se determinó que *Caprina EHC* pertenece a la especie *E. coli*, con base a la secuencia del fragmento ribosomal de una *Escherichia coli* cepa NBRC 102203. El 100% del fragmento de la secuencia analizada, presentó una identidad del 99.93% con las siguientes especies: *Escherichia coli* NBRC 102203, *E. fergusonii* y algunas especies de *Shigella* (Tabla 25). La secuencia completa se encuentra en el Anexo 4.

Dominio: Bacteria

Reino: Eubacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichia*

Especie: *E. coli*

El árbol filogenético nos reveló que *Caprina EHC* es una bacteria que no se agrupa junto con las *E. coli*, sin embargo, es el grupo más cercano en relación a las secuencias comparadas (Fig. 22). La prueba bioquímica API 20e ubicó a *Caprina EHC* como una *E. coli*. Por último, se sembró *Caprina EHC* en medio de cultivo *Salmonella-Shigella*, donde se observaron colonias rosadas, lo que nos confirmó que se trata de

una *Escherichia*. Para asegurar que *Caprina EHC* es una *E. coli* o se trata de otra especie se requiere del estudio de otros genes, la conclusión es que *Caprina EHC* es una *E. coli* atípica.

Se ha aislado *E. coli* a partir de líquido ruminal de ovino para estudiar la producción de H₂ (Jame *et al.*, 2011), e incluso se ha reportado su producción a partir de FORSU con *E. coli* en co-cultivo con *Enterobacter aerogenes* (Sharma & Melkania, 2017). En el presente trabajo se documentó la capacidad de *Caprina EHC* para producir H₂ en condiciones anaerobias a partir de FORSU (Fig. 25).

Se ha reportado que bacterias productoras de H₂Succ y bacterias fermentadoras de ácido láctico tienden a ser más resistentes a antibióticos (Henderson *et al.*, 1981; Salem *et al.*, 2011). La bacteria *E. coli* es productora de ácido fórmico, acético y H₂Succ, se ha documentado un incremento en su población de al menos 50 veces a bajas concentraciones de monensina (5.8 mg L⁻¹) en rumen artificial (Kisidayova *et al.*, 2009). Además, se ha reportado su presencia en suelos contaminados con los dos antibióticos lasalocid y monensina (Netthisinghe *et al.*, 2013).

Caprina EHC produjo 1.45 g L⁻¹ de H₂Succ a partir de hidrolizado de FORSU en una fermentación convencional, encontrando que el ácido acético y el ácido fórmico son productos concomitantes importantes (Fig. 22).

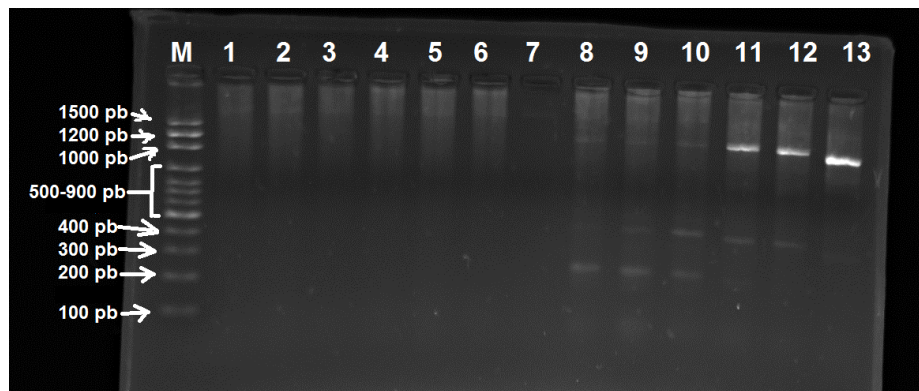


Figura 20. Amplificación de fragmento de DNA de ~1459 pb de la subunidad ribosomal 16s. M: Marcador de peso molecular 100 pb. Gel de agarosa al 2.5%, gradiente de temperaturas (°C) 1-6: 8: 55.6, 9: 56.1, 10: 56.9, 11: 57.8, 12: 58.5 & 12: 58.9. Gel de agarosa al 2.5%, 100 V durante 1 h. 4 µL de producto de PCR + 3 µL de GelRed™.

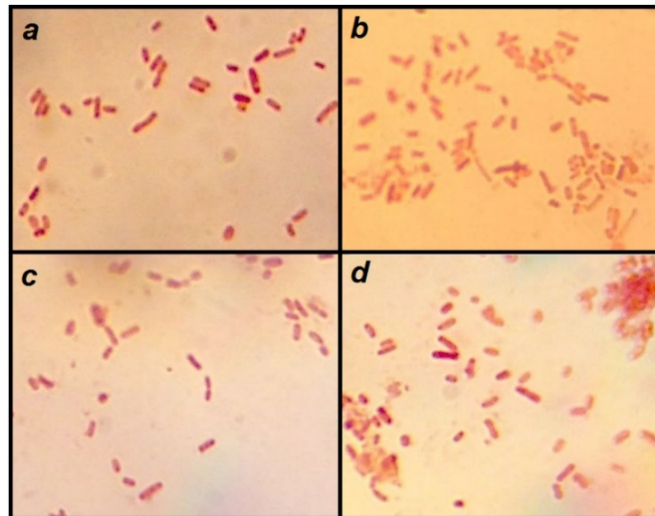


Figura 21. Tinción Gram. bacterias productoras de H₂Succ. (A & B) *Actinobacillus succinogenes* y (C & D) bacteria aislada de rumen de caprino.

Tabla 25. Identidad de la subunidad ribosomal 16s entre la bacteria aislada y las bacterias relacionadas.

Especie	Numero de accesión	Similitud (%)
<i>E. coli</i> isolate NQ3	CP024720.1	99.93
<i>E. coli</i> strain LS4	CP024717.1	99.93
<i>E. coli</i> O128:H27 strain 90-9281	CP024243.1	99.93
<i>E. fergusonii</i> strain GT2	KY357308.1	99.93
<i>E. coli</i> JJ1886	CP006784.1	99.93
<i>E. coli</i> PMV-1	HG428755.1	99.93
<i>Shigella flexneri</i> strain E58	HQ407235.1	99.93
<i>E. coli</i> UM146	CP002167.1	99.93
<i>S. boydii</i> strain FBD006	EU009177.1	99.93
<i>Escherichia sp.</i> CN1-OB13	LC271156.1	99.86
<i>E. coli</i> strain 13E0780	CP020106.1	99.86
<i>E. coli</i> strain Ecol_545	CP018976.1	99.86
<i>E. coli</i> strain b	MF754138.1	99.79

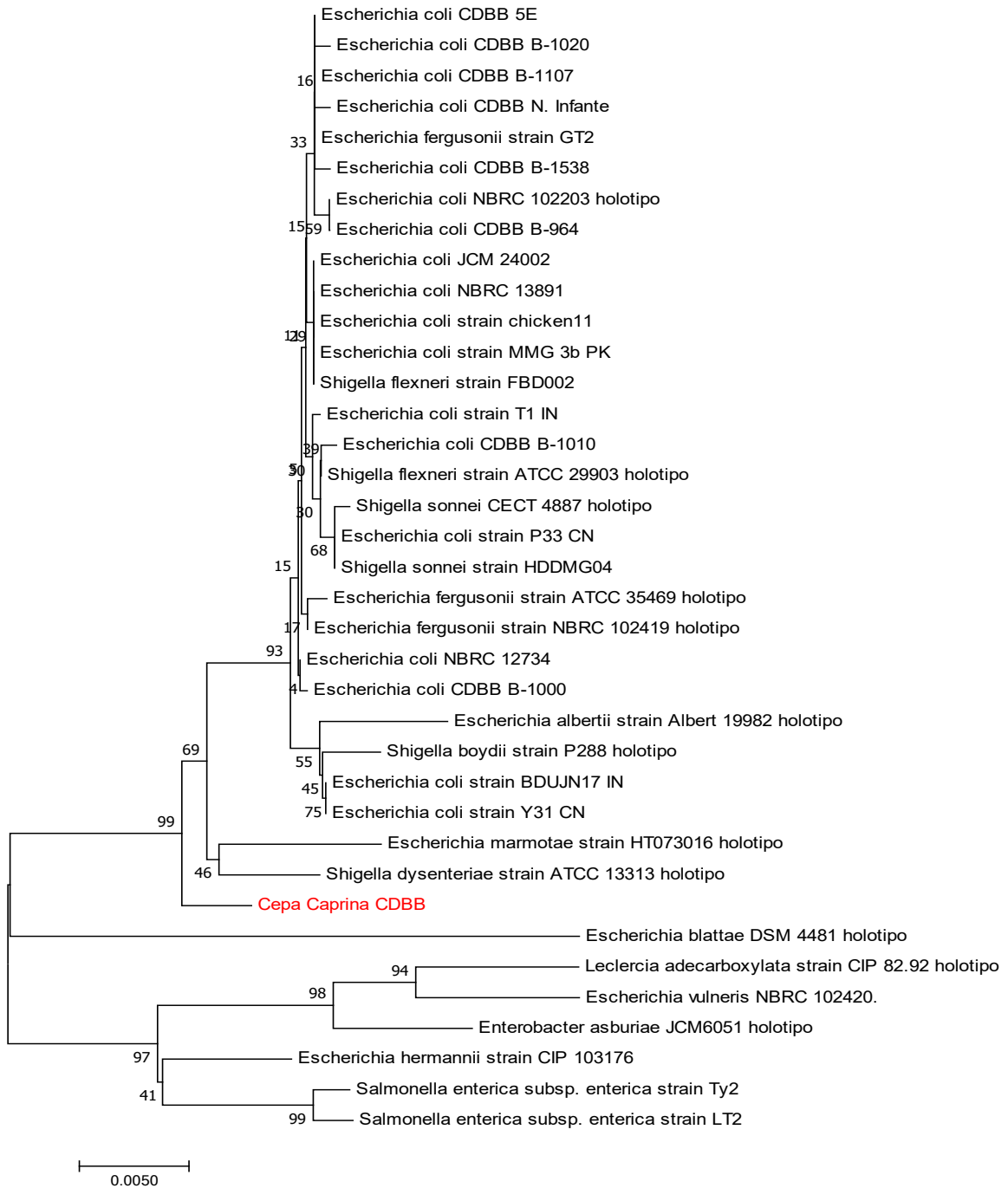


Figura 22. Árbol filogenético de la bacteria aislada *Caprina EHC* y los microorganismos relacionados basados en su secuencia de la subunidad ribosomal 16s. Barra de escala 0.0050 representa 10 substitución de bases por 100 bases.

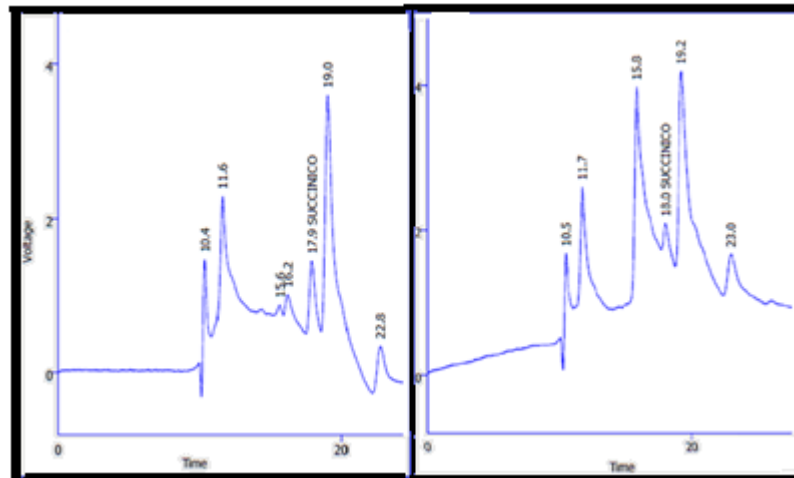


Figura 23. Producción de ácido succínico. Producción de ácido succínico por bacterias aisladas a y b de fermentación por 24 h.

Se realizó una fermentación convencional de la cepa aislada *Caprina EHC* y la bacteria *A. succinogenes*. En la Fig. 24 se puede observar los productos finales de la fermentación.

Caprina EHC resultó positiva para la prueba citocromo C oxidasa, β -galactosidasa, arginina dihidrolasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, y fue capaz de fermentar glucosa, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa y arabinosa. *Caprina EHC* produce hidrógeno a partir de hidrolizado de FORSU (Fig. 25)

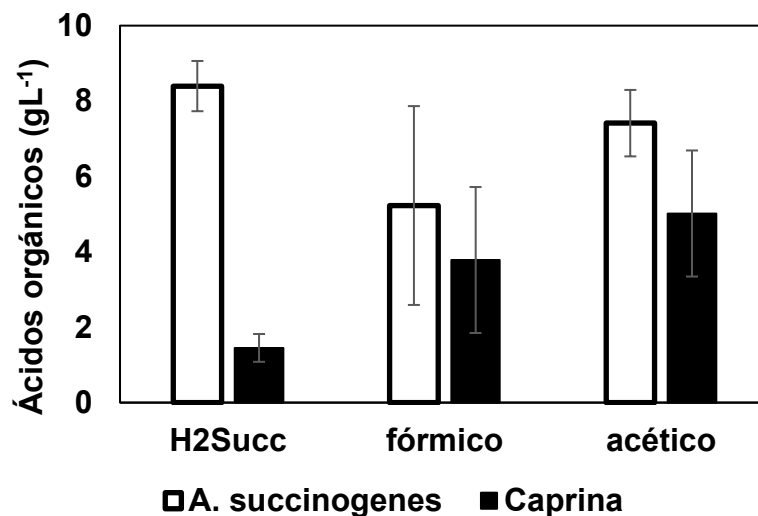


Figura 24. Producción final de ácido succínico y ácidos concomitantes con a 48 h de *A. succinogenes* y bacteria aislada *Caprina EHC*.

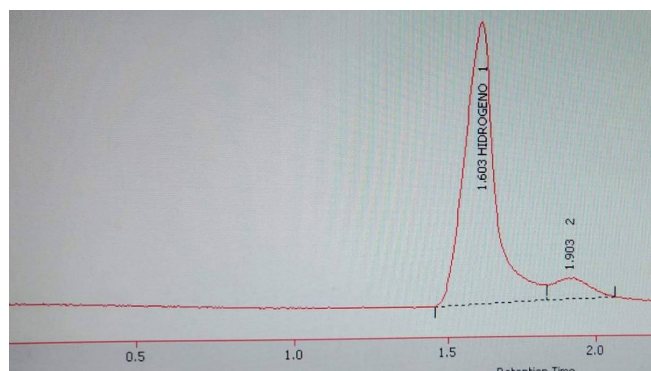


Figura 25. Cromatograma de producción de hidrógeno por parte de *Caprina EHC*.

6.4. Evaluación de la producción de ácido succínico a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos mediante una celda de electrosíntesis microbiana evaluando Nafion *versus* agar como separadores o *A. succinogenes versus Caprina EHC* como biocatalizador.

Los resultados se muestran en la Tabla 26 y Figuras 26 a la 40. Las gráficas que muestran el consumo de corriente para todas las electrofermentaciones de T1 a T4 se muestran en el Anexo 8. Los cromatogramas de los ácidos orgánicos y los azúcares (sustrato) se muestran en el Anexo 5. A su vez, los ANOVA de las variables de respuesta de las electrofermentaciones se encuentran detallados en el Anexo 7.

6.4.1. Evaluación de una membrana de intercambio protónico de bajo costo y contraste de su eficiencia con una membrana de Nafion.

6.4.1.1. Producción de ácido succínico por *A. succinogenes* a partir de hidrolizado de FORSU en una celda de electrosíntesis microbiana con bicarbonato de sodio como fuente de CO_2 y pH anódico de 7.2.

Se realizó una primera electrofermentación indagatoria, en donde se colocaron 10 g L^{-1} como fuente de HCO_3^- y el pH del ánodo se ajustó a 7.2 (en las siguientes electrofermentaciones se utilizaron 40 g L^{-1} de MgCO_3 y el pH en el ánodo se ajustó a 3). Se obtuvo una producción de H_2Succ de 5.5 g L^{-1} (Fig. 26) .Se observó un menor crecimiento de la biomasa planctónica cuando se le suministro un potencial eléctrico

de -1.8 V y mayor biomasa adherida al cátodo (Fig. 28); estos resultados fueron inversamente proporcionales con respecto al grupo control sin electricidad.

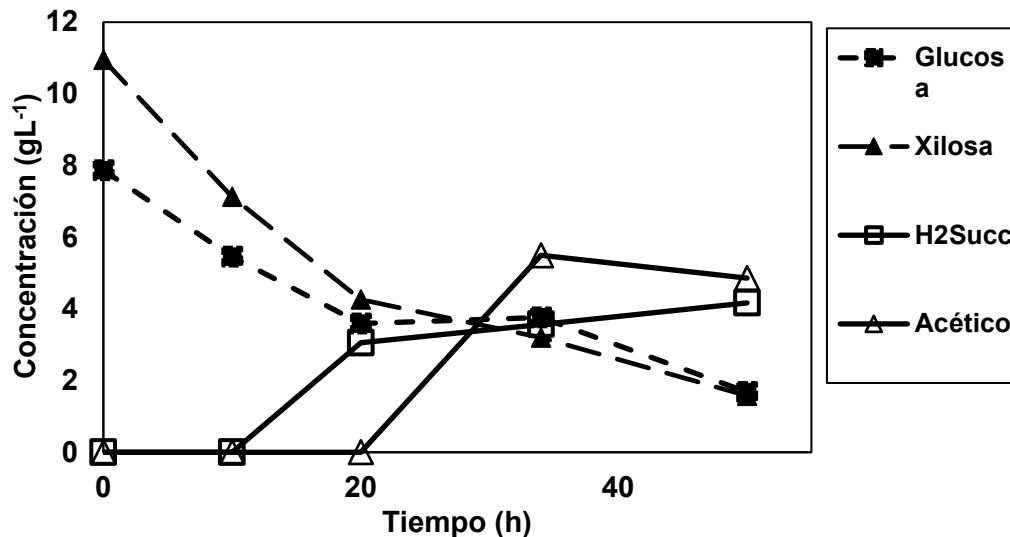


Figura 26. Electrofermentación en cámara catódica de *A. succinogenes* con hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos como fuente de carbono

Se pudo observar que en una primera etapa de la electrofermentación el consumo de corriente se incrementa en la CESIM, se cree que este consumo se debió en parte a la oxidación del rojo neutro (Fig. 28). Park *et al.* (1999) evaluaron un cultivo de *A. succinogenes* con glucosa como fuente de carbono en un reactor electroquímico con rojo neutro como mediador, y un voltaje establecido en -2.0 V en el cátodo; en ese trabajo se reportaron consumos de corriente de entre 1.5 a 10 mA, algo similar se encontró en el presente trabajo en donde los consumos de corriente se ubicaron entre 1.1 a 7.4 mA (Fig. 28).

La microscopía electrónica de barrido reveló que la colonización del cátodo por *A. succinogenes* resultó favorecida en un 194% por la aplicación de energía eléctrica en la CESIM vs un cultivo control sin energía eléctrica en CESIM (Fig. 29). Sin embargo, se ha reportado que la transferencia de electrones del cátodo hacia *A. succinogenes* puede ocurrir de manera indirecta con ayuda de un compuesto mediador como el rojo neutro (Park *et al.*, 1999). Considerando la suma de las biomasa total (biomasa adherida al cátodo y planctónica), en la CESIM con suministro de energía eléctrica se obtuvo 28.6% menos biomasa con respecto al grupo control sin electricidad (Fig.27B).

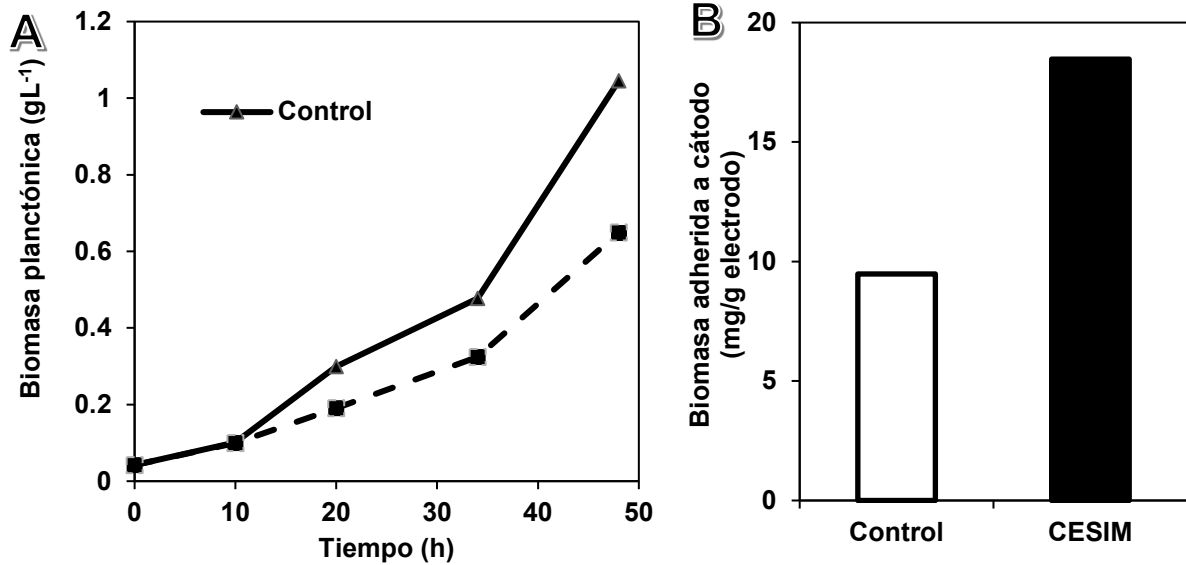


Figura 27. Biomasa en cámara catódica de *A. succinogenes* con hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos como fuente de carbono en electrofermentación y fermentación convencional. (A) Biomasa planctónica; (B) Biomasa adherida a las 48 h de cultivo sobre el cátodo.

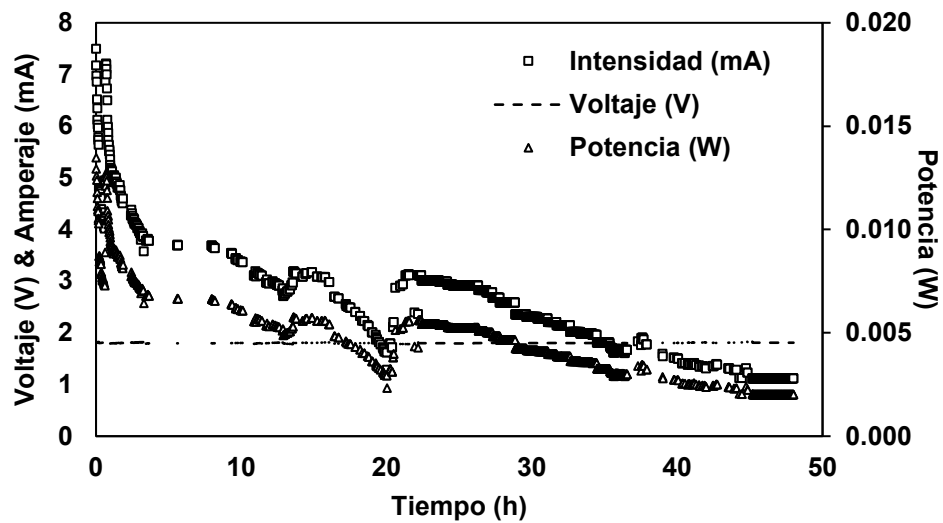


Figura 28. Consumo de corriente en producción de ácido succínico por *A. succinogenes* a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos mediante una celda de electrosíntesis microbiana.

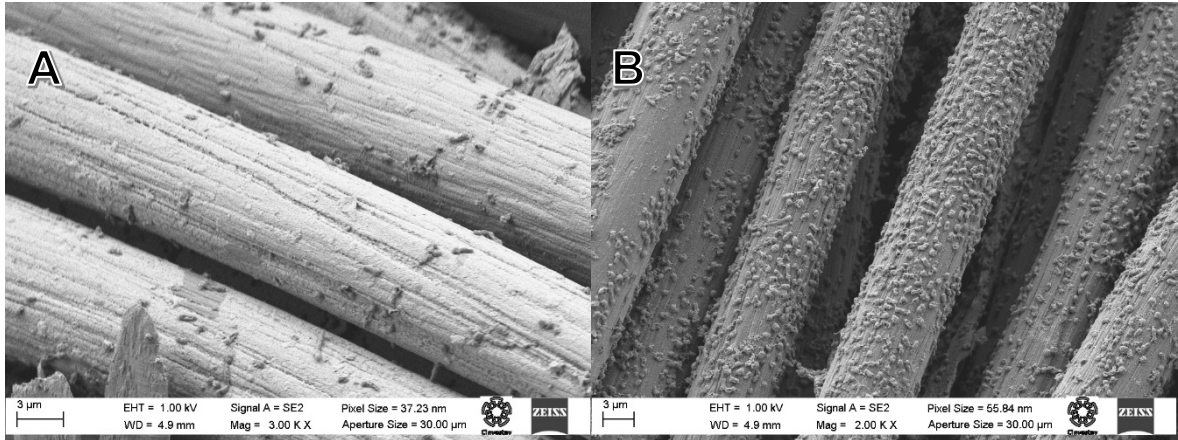


Figura 29. Micrografía de microscopia electrónica de barrido del centro del cátodo (tela de carbono) de una celda de electrosíntesis microbiana destinada a la producción de ácido succínico a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos por un cultivo de *A. succinogenes* (a) sin electricidad (b) con electricidad potencial mantenido a -1.8V. Escala de las barras A= 3 μm & B= 3 μm.

6.4.1.2. Producción de ácido succínico por *A. succinogenes* a partir de hidrolizado de FORSU en una celda de electrosíntesis microbiana con carbonato de magnesio como fuente de CO₂ y pH anódico de 3

Se realizó una electrofermentación con membrana Nafion como separador en una CESIM inoculada con *A. succinogenes* y alimentada con hidrolizado de FORSU. La membrana Nafion fue capaz de mantener el desbalance inicial de pH en ambas cámaras de la CESIM (pH 3 para el ánodo y pH 7.2 para el cátodo; Fig. 37); La membrana Nafion utilizada a pH neutro permitió la migración del 24 y 12% de glucosa y xilosa, respectivamente del cátodo hacia el ánodo, los cuales no fueron aprovechados por *A. succinogenes* para la síntesis de H₂Succ (Fig. 35).

Un fenómeno similar ocurrió con los ácidos orgánicos producidos en la CESIM, con la migración del ácido fórmico, acético y el H₂Succ en el siguiente porcentaje 73.2, 34.9 y 13.7%, respectivamente (Fig. 33 y 35). Se ha reportado que el H₂Succ forma puentes de hidrógeno intermoleculares, lo que incrementa el tamaño de las moléculas, esta característica podría contribuir a la baja permeabilidad en el Nafion, en comparación con otras moléculas como el ácido acético y el ácido fórmico (Sheng *et al.*, 2016). Se ha reportado que la remoción de compuestos concomitantes favorece la síntesis del producto objetivo, en este caso el H₂Succ (Awate *et al.*, 2017). Por lo cual es posible que el incremento en un 113% en el rendimiento de H₂Succ con respecto al

control sin electricidad, sea en parte debida al desplazamiento entre las cámaras de los ácidos concomitantes producidos.

Se ha reportado que *A. succinogenes* Z130 es capaz de asimilar la celobiosa (Guettler *et al.*, 1999), sin embargo, en el presente trabajo no se observó su consumo independientemente del tipo de separador (Fig. 30 y 31).

Se realizó una electrofermentación con membrana agar al 2% como separador en una CESIM inoculada con *A. succinogenes* y alimentada con hidrolizado de FORSU. Esta electrofermentación produjo un 113% de H₂Succ con respecto a la fermentación convencional. Se pudo observar que la membrana de agar permitió el libre paso de los electrolitos (Fig. 32 y 34), y al realizar una tinción de Gram para verificar la presencia de microorganismos colonizando el ánodo, se comprobó la colonización por *A. succinogenes* (Fig. 36). El fenómeno anterior sólo puede ser explicado por la incapacidad de la membrana de agar como separador, generando una mezcla del contenido entre ambas cámaras.

Las características que deben cumplir las MIP de alto rendimiento incluyen (i) alta conductividad protónica, (ii) baja conductividad eléctrica, (iii) poca permeabilidad al producto y oxidantes, (iv) bajo transporte de agua debido a difusión o electroosmosis, (vii) bajo costo, (viii) ensamblaje membrana-electrodo (Hickner *et al.*, 2004), además de resistencia mecánica. En el presente trabajo se pudo constatar la hidratación de la membrana de agar y su poca resistencia mecánica al permitir el paso libre de electrolitos y biomasa.

Cuando se coloca un separador de agar se obtiene un rendimiento superior al rendimiento alcanzado por Zhao *et al.* (2016) y en casi la mitad del tiempo (Tabla 26).

Tabla 26. Producción de ácido succínico, rendimiento y relación con compuestos concomitantes.

	Agar	Nafion	Zhao <i>et al.</i>
Tiempo (h)	36	48	~60
Rendimiento (g H ₂ Succ/g sustrato)	0.64	0.56	0.60
H ₂ Succ:concomitantes	1:1.14	1:1.18	NR
H ₂ Succ/acético	1.80	1.58	NR

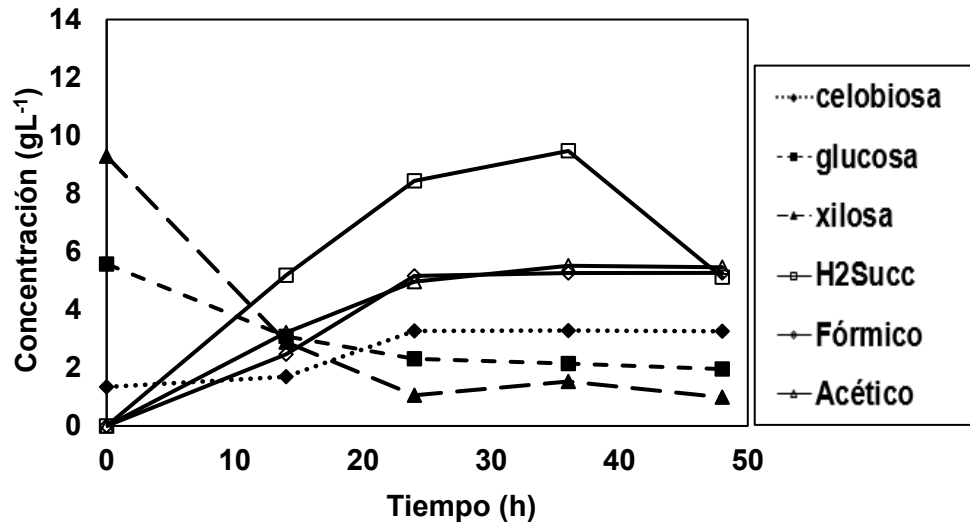


Figura 30. Cinética de producción de ácido succínico y consumo de sustrato de *A. succinogenes* a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en celda de electrosíntesis utilizando como separador membrana de agar.

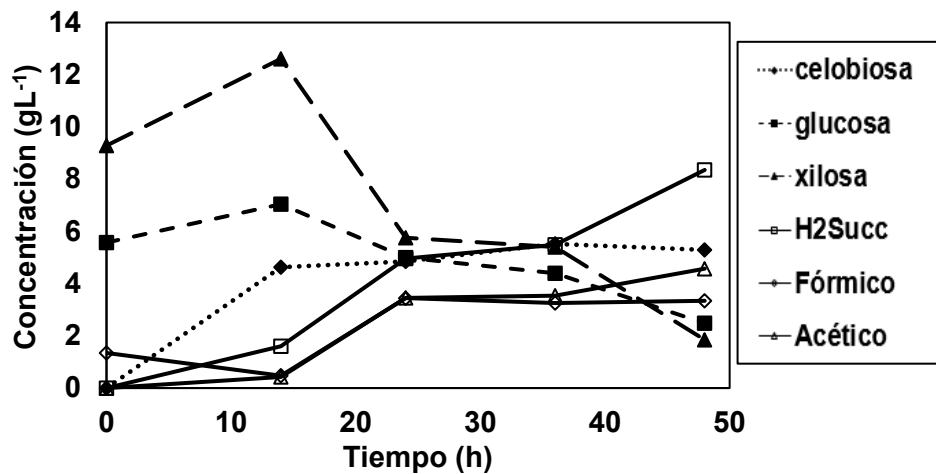


Figura 31. Cinética de producción de ácido succínico y consumo de sustrato de *A. succinogenes* a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en celda de electrosíntesis utilizando como separador membrana de Nafion.

En la figura 38 se muestra la biomasa planctónica que se produjo en la CESIM, cabe resaltar que los valores mostrados son la suma de la biomasa planctónica registrada en el ánodo y cátodo. En el caso de la CESIM con separador de Nafion, la biomasa sólo se encontró en el cátodo y para la CESIM con separador de agar al 2%, la biomasa se encontraba en ambas cámaras. La CESIM con separador de Nafion sólo presentó 18.6 mg g^{-1} de biomasa adherida al cátodo y no hubo colonización en el ánodo, y para la CESIM con separador con agar presentó 21.5 mg g^{-1} de biomasa

adherida al cátodo y 16.6 mg g^{-1} de biomasa adherida al ánodo, es decir 30% más de biopelícula en cátodo.

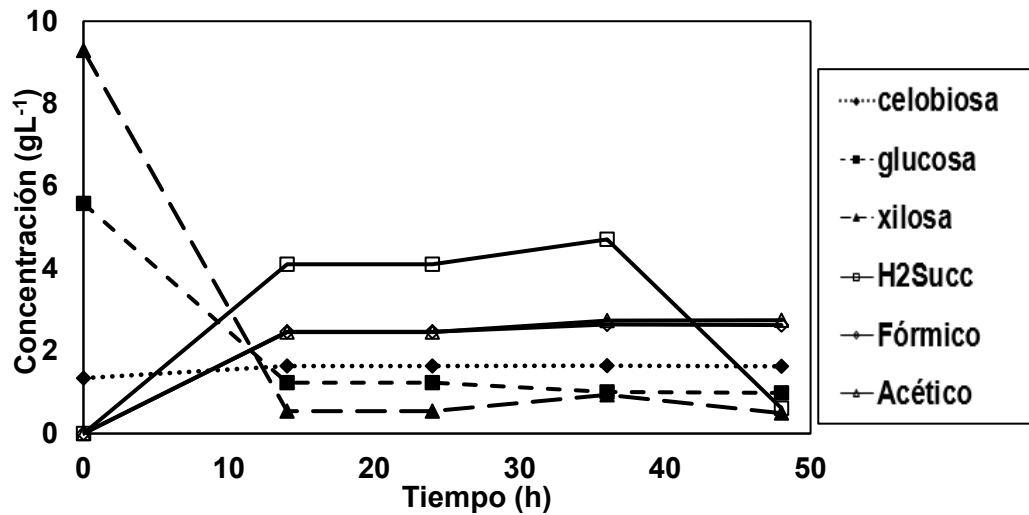


Figura 32. Cinética de producción de ácido succínico y consumo de sustrato de *A. succinogenes* a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en la cámara catódica de celda de electrosíntesis utilizando como separador membrana de agar.

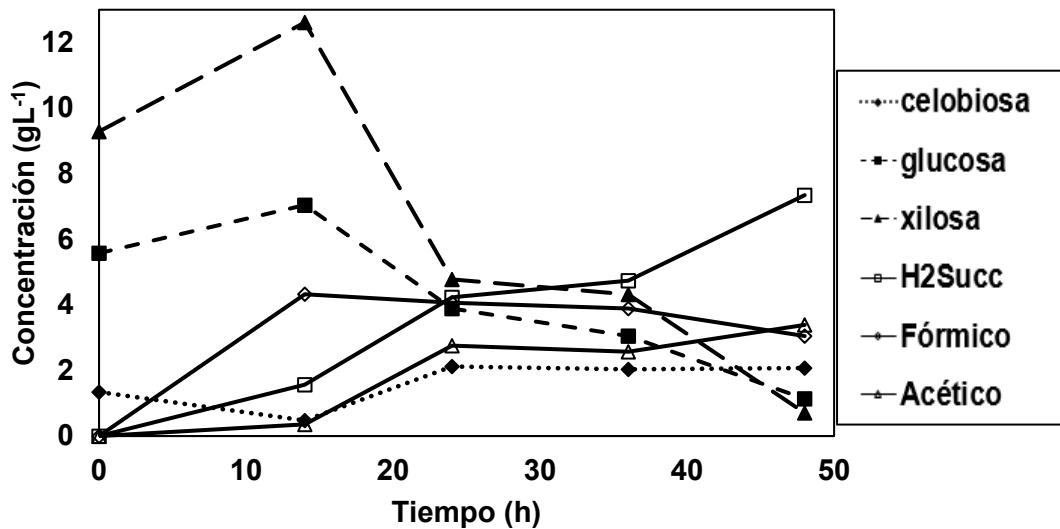


Figura 33. Cinética de producción de ácido succínico y consumo de sustrato de *A. succinogenes* a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en la cámara catódica de celda de electrosíntesis utilizando como separador membrana de Nafion.

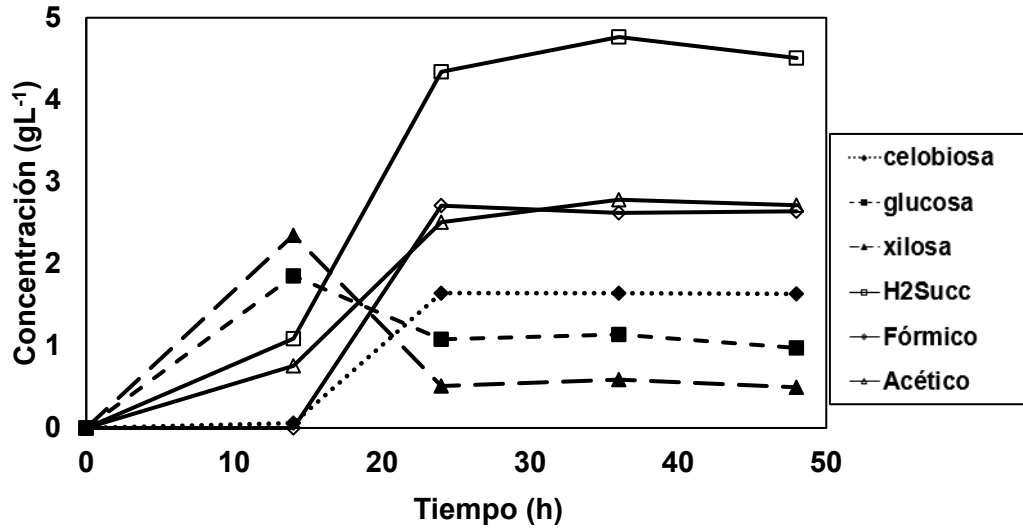


Figura 34. Cinética de producción de ácido succínico y consumo de sustrato de *A. succinogenes* a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en la cámara anódica de celda de electrosíntesis utilizando como separador membrana de agar.

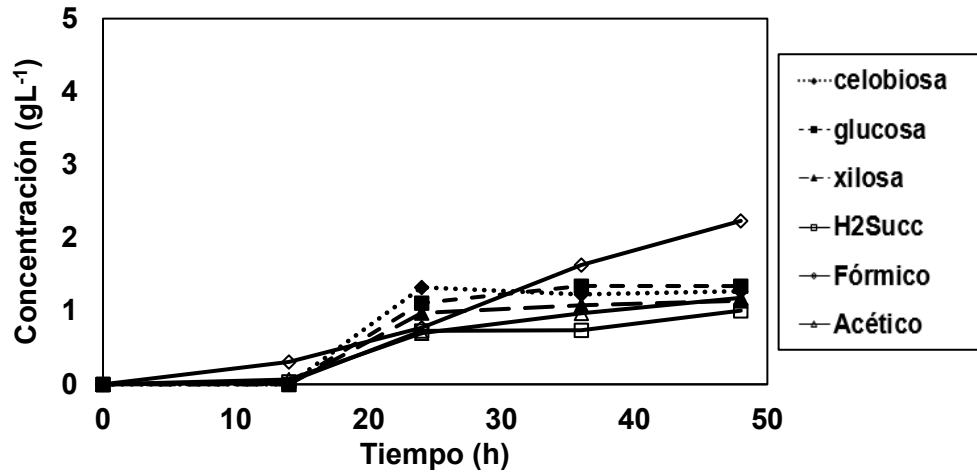


Figura 35. Cinética de producción de ácido succínico y consumo de sustrato de *A. succinogenes* a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en la cámara anódica de celda de electrosíntesis utilizando como separador membrana de Nafion.

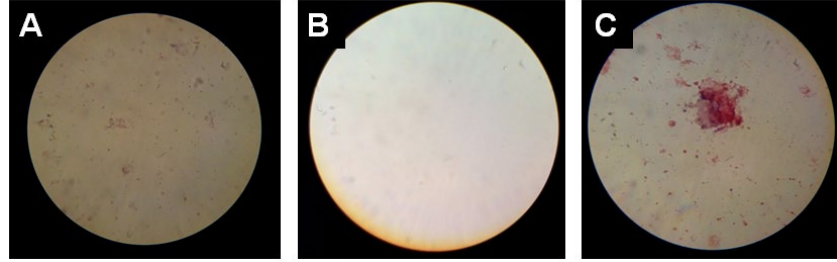


Figura 36. Tinción de Gram de bacterias presentes en medio de cultivo al final de la fermentación en: (A) cámara anódica de CESIM con membrana de agar; (B) membrana de Nafion; (C) cámara catódica con membrana de Nafion. Vistas a 100X.

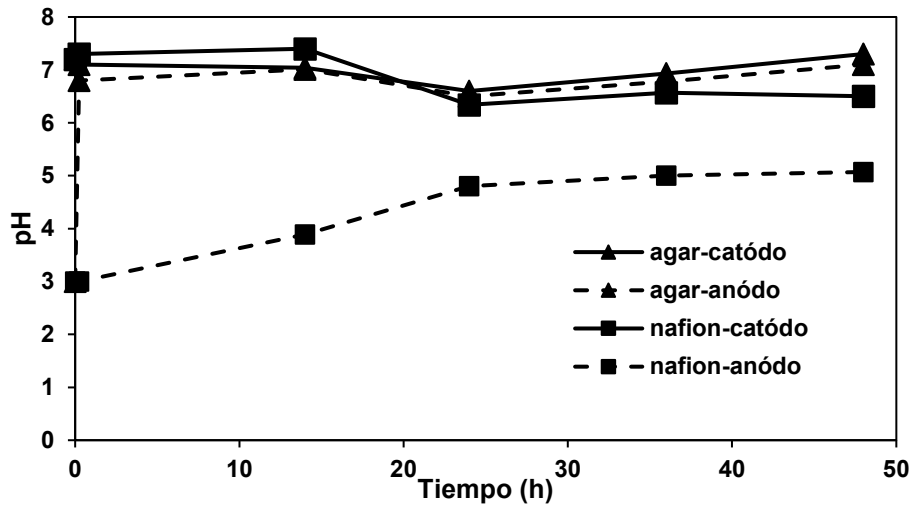


Figura 37. pH en celda de electrosíntesis microbiana con diferente separador membrana de agar vs Nafion y cultivo de *A. succinogenes* para producción de ácido succínico a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos.

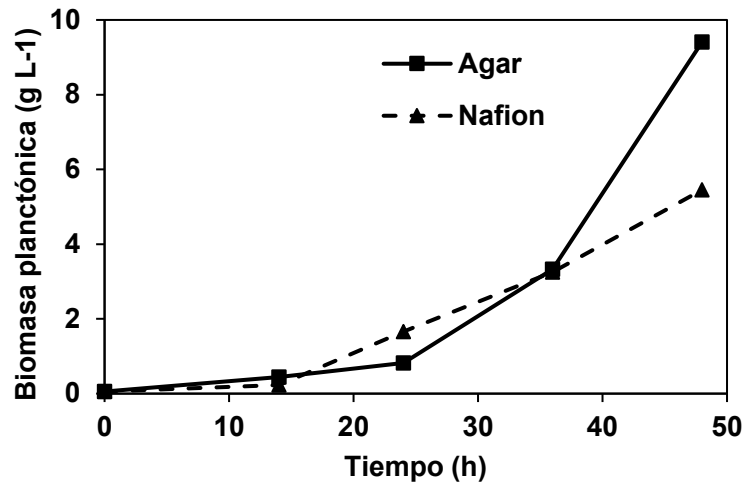


Figura 38. Biomasa planctónica en celda de electrosíntesis microbiana con diferente separador de Nafion o de agar y cultivo de *A. succinogenes* para producción de ácido succínico a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos.

6.4.2. Producción de ácido succínico por *Caprina EHC* en una celda de electrosíntesis microbiana.

Se realizó una electrofermentación con membrana Nafion como separador en una CESIM inoculada con *Caprina EHC* y alimentada con hidrolizado de FORSU, esta electrofermentación produjo 223% más de H₂Succ con respecto a la fermentación convencional (Fig. 40). *Caprina EHC* mostró la capacidad de degradar la celobiosa a diferencia de *A. succinogenes* (Fig. 39). Además, se registró una producción de ácidos orgánicos concomitantes 234.7% y un 6% más de ácido fórmico y ácido acético, respectivamente con respecto a la fermentación convencional (cepa *Caprina EHC* sin electricidad) (Fig. 40). La biomasa planctónica presente en la CESIM fue de 5.73 g L⁻¹, mientras que la biomasa adherida al cátodo alcanzó 29.1 mg g⁻¹ de cátodo; fue la mayor adhesión de biomasa al cátodo reportada en el presente ensayo.

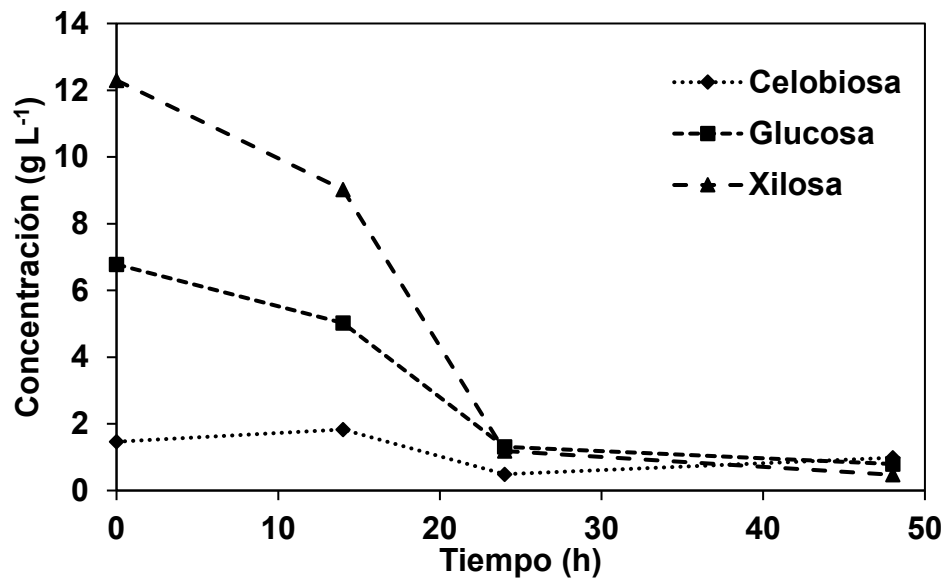


Figura 39. Cinética de consumo de sustrato de *Caprina EHC* a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en la celda de electrosíntesis microbiana utilizando como separador membrana Nafion.

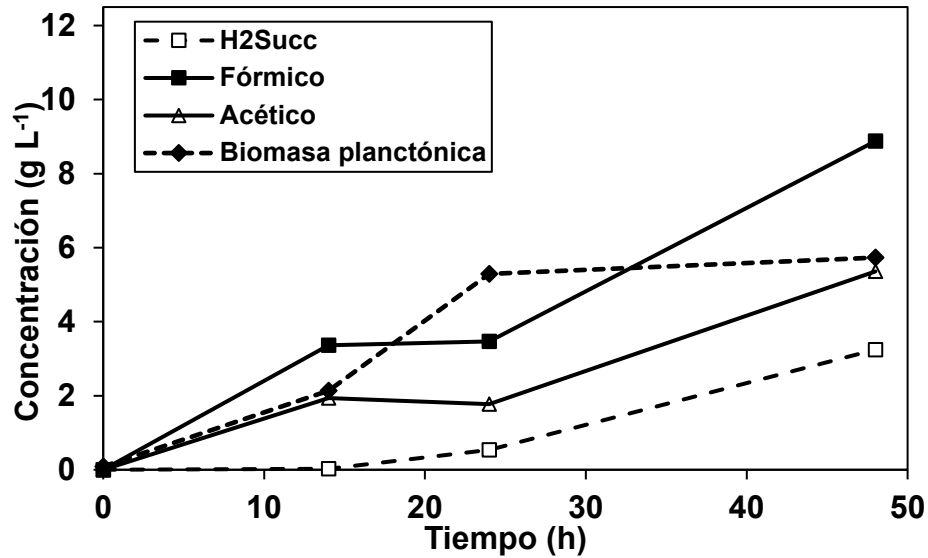


Figura 40. Cinética de producción de ácidos orgánicos por *Caprina EHC* a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en la celda de electrosíntesis microbiana utilizando como separador membrana Nafion.

6.5. Determinación de los requerimientos energéticos (térmicos y eléctricos) para operar la CESIM a 37 °C durante el tiempo de fermentación

Los resultados de la presente sección se muestran en las Tablas 27 a la 30 y las Figuras 41 a la 46.

De acuerdo con las ecuaciones 3 y 4, se muestran en la Tabla 27 los rendimientos y pseudorendimientos de los tratamientos evaluados en el presente trabajo. Se puede observar que el suministro de $MgCO_3$ es un factor clave para la producción de H_2Succ (Zhang *et al.*, 2012). Si se toma en cuenta únicamente el sustrato consumido como se muestra en el rendimiento, se puede notar que las electrofermentaciones en donde el separador fue Nafion o agar, los rendimientos (T1 y T2) obtenidos fueron similares.

Las dimensiones de la CESIM fueron largo 0.101 m, ancho 0.024 m y altura de 0.2525 m, lo que ubicaría a la CESIM en un reactor tipo cara plana, las dimensiones y parámetros de operación se muestran en la Tabla 28. Como aislante para cálculos teóricos se propone espuma de poliuretano.

Tabla 27. Rendimiento y pseudorendimiento de la producción de ácido succínico de los tratamientos evaluados.

Tratamiento	Y' g H ₂ Succ/g sustrato ^a	Y g H ₂ Succ/g sustrato consumido ^b
T1 (Nf ^f - <i>A succinogenes</i> - MgCO ₃)	0.562	0.793
T2 (Agar- <i>A succinogenes</i> - MgCO ₃)	0.637	0.795
T3 (Nf- <i>Caprina EHC</i> - MgCO ₃)	0.169	0.182
T4 (Nf- <i>A succinogenes</i> - NaHCO ₃)	0.221	0.266

^aY': Pseudorendimiento (Calculado a 48 h de fermentación para *A. succinogenes* y 36 h de fermentación para *Caprina EHC*); ^b Y: rendimiento (Calculado considerando el sustrato consumido a 48 h de fermentación para *A. succinogenes* y 36 h de fermentación para *Caprina EHC*).

6.5.1. Capacidad calorífica y densidad relativa del medio de cultivo

Se emplearon las ecuaciones propuestas por Perez-Heredia *et al.* (2017) para determinar la capacidad específica (Ec. 24) y la densidad del medio de cultivo (Ec. 25), ya que los autores desarrollaron una serie de ecuaciones en donde se considera la temperatura, la relación másica entre el extracto de levadura y la fuente de carbono y la concentración de materia seca en el cultivo.

$$C_{pm.cultivo} = 2.2702 + (0.2117 \times R_{EL/S}) - (0.0016863 \times C_{ms}) + (0.0597 \times ^\circ C) \quad [24]$$

$$\rho_{m.cultivo} = (1032.81 - (16.275 \times R_{EL/S}) + (0.347 \times C_{ms})) / 1000 \quad [25]$$

donde $C_{pm.cultivo}$ hace referencia a la capacidad calorífica del medio de cultivo; $R_{EL/S}$ significa la relación másica entre el extracto de levadura y el sustrato; C_{ms} se refiere a la concentración de materia seca en el medio de cultivo, únicamente se consideró la biomasa (peso seco); $\rho_{m.cultivo}$ significa la densidad del medio de cultivo.

Tabla 28. Dimensiones y parámetros de operación de la celda de electrosíntesis microbiana

Variable	Valor
Velocidad de rotación (rpm)	180
Densidad del medio de cultivo (kg m^{-3})	1026
Viscosidad del medio de cultivo (cp)	1
Volumen de trabajo (m^3)	0.00018
Tiempo de operación (h)	36 o 48
Área externa de la CESIM (m^2)	0.0675
Masa del acrílico en CESIM (kg)	0.88
Conductividad térmica del acrílico ($\text{W m}^{-1} \text{K}^{-1}$)	0.19
Espesor del acrílico (m)	0.025
Calor específico del acrílico ($\text{kJ kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)	1.4654
Área externa de la espuma de poliuretano en CESIM (m^2)	0.1575
Masa del poliuretano en CESIM (kg)	0.3964
Conductividad térmica de la espuma de poliuretano ($\text{W m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)	0.024
Espesor de la espuma de poliuretano (m)	0.025
Calor específico del poliuretano ($\text{kJ kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)	1.40
Temperatura de operación (K)	310.15
Temperatura ambiente (K)	293.15
Calor específico del medio con biomasa ($\text{kJ kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)	4.58
Masa del medio de cultivo (kg)	0.185
Área externa del fermentador convencional (m^2)	0.0675
Masa del fermentador convencional (kg)	0.319
Conductividad térmica del fermentador convencional ($\text{W m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)	0.80
Espesor del fermentador convencional (m)	0.002
Calor específico del fermentador convencional ($\text{kJ kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)	0.832
Área externa del poliuretano en fermentador convencional (m^2)	0.0829
Masa del poliuretano en fermentador convencional (kg)	0.332

Referencias: Rohsenow *et al.* (1998); Felder & Rousseau, (2005); Tippens (2011).

6.5.2. Energía total requerida por la electrofermentación

Los resultados de consumos energéticos de las electrofermentaciones T1 a T4 y de las correspondientes fermentaciones convencionales se describen en la Tabla 29. En la tabla 30 se muestra en detalle la relación entre la producción de H₂Succ y los ácidos orgánicos concomitantes.

6.5.2.1. Energía por calefacción

Primero se estima las pérdidas de calor al aire del dispositivo lleno con líquido a 37 °C. Para determinar la energía por calefacción se emplearon las ecuaciones de la 26- 29, 32.

U es el valor del coeficiente global de transferencia de calor y expresa la tasa de transferencia de calor, en este caso de la pared de la CESIM al ambiente (Brown, 1950).

$$\frac{1}{UA_2} = \frac{e_1}{k_1A_1} + \frac{e_2}{k_2A_2} + \frac{1}{hA_2} \quad [26]$$

$$\frac{1}{1.173} \approx \left(\frac{0.025}{0.19 \times 0.0675} + \frac{0.025}{0.024 \times 0.1575} + \frac{1}{10 \times 0.1575} \right) \approx 9.20 \text{ W} \quad [27]$$

$$UA_2 = \frac{1}{9.20} = 0.11 \text{ W} \quad [28]$$

donde $e_{\text{acrílico}}$ (e_1) y e_{aislante} (e_2) se refieren al espesor de acrílico y del aislante, respectivamente; $K_{\text{acrílico}}$ (k_1) y K_{aislante} (k_2) se refieren a las conductividades térmicas de cada material, A_1 es el área externa de la celda de acrílico, A_2 es el área externa con aislación térmica, h es el coeficiente de convección natural pared externa aislación térmica -aire ambiente.

\dot{q} es el flujo de calor por pérdida al ambiente (W) dado por (Ec. 29):

$$\dot{q} = UA_{\text{externa}}(T_{\text{oper}} - T_{\text{amb}}) \quad [29]$$

donde T_{oper} y T_{amb} significan la temperatura operacional y la temperatura ambiente, respectivamente (Ec. 30).

$$\dot{q} = 0.11 \times (310.15 - 293.15) = 1.848 \text{ W} \quad [30]$$

Simbolizando con q las pérdidas de calor al ambiente del dispositivo durante el tiempo de operación Δt en segundos, se tendrá (Ec. 31a & Ec. 31b).

$$q_{48} = \dot{q} \times \Delta t = 1.848 \times 172800 = 319374 \text{ J, para 48 h operación} \quad [31a]$$

$$\text{y } q_{36} = 239500 \text{ J para 36 h de operación} \quad [31b]$$

(los tratamientos 1, 3, y 4 duraron 48 h, el tratamiento 2 duró 36 h).

Segundo, se calcula el calor sensible requerido q_i (por lote) para aumentar la temperatura desde la temperatura ambiente a la temperatura de operación de la celda,

del cultivo líquido contenido, y de la aislación térmica (tanto el acrílico de la celda como la aislación térmica tendrán temperaturas intermedias entre 37 y 20 °C, pero nuestro cálculo será conservador hacia arriba.), ver Ec 29:

$$q_i = m_{CESIM} \times C_{p \text{ acrílico}}(T_{oper} - T_{amb}) + m_{m.cultivo} \times C_{p m.cultivo}(T_{oper} - T_{amb}) + m_{aislante} \times C_{p aislante}(T_{oper} - T_{amb}) \quad [32]$$

donde m_{CESIM} significa la masa del acrílico (CESIM); $C_{p \text{ acrílico}}$ es el calor específico del acrílico; $m_{m.cultivo}$ se refiere a la masa del medio de cultivo; $C_{p m.cultivo}$ es el calor específico del medio de cultivo; $m_{aislante}$ significa la masa del aislante; $C_{p aislante}$ se refiere al calor específico del aislante.

Sustituyendo los valores de la CESIM (Ec. 33).

$$q_i = 0.88 \times 1.4654(310.15 - 293.15) + 0.185 \times 4.58(310.15 - 293.15) + 0.3964 \times 1.4(310.15 - 293.15) = 45.76 \text{ kJ} \quad [33]$$

La energía de calefacción total q_{total} se calcula como la suma de las pérdidas de calor al ambiente y el calor sensible requerido, a saber (Ec. 34a & 34b)

$$q_{total \ 48} = q + q_i = 319.37 + 45.76 = 365.13 \text{ kJ} \quad [34a]$$

$$q_{total \ 36} = q + q_i = 239.5 + 45.76 = 285.3 \text{ kJ} \quad [34b]$$

6.5.2.2. Energía eléctrica

La energía eléctrica se calculó multiplicando integrando la potencia versus tiempo de operación durante el intervalo de operación, utilizando la ecuación trapezoidal de integración numérica (Chapra & Canale, 2003) (Anexo 8).

6.5.2.3. Energía de mezclado

La potencia de mezclado por unidad de volumen (π_v) se determinó en caballos de fuerza por pie cubico (HP ft⁻³) (Brown, 1950). Se determinó la energía de mezclado a partir de la Ec. 35.

$$\pi_v = \frac{12x\rho_{rel}(10 + \sqrt[4]{\mu'})}{C} \quad [35]$$

donde ρ_{rel} es la densidad relativa del medio de cultivo, μ' se refiere a la viscosidad del medio de cultivo ~1 centipoise (cp). C significa el coeficiente de la intensidad del mezclado (ft³ HP⁻³), el cual está reportado 300 para un mezclado de alta intensidad y 3300 para un mezclado de baja intensidad, en el presente ensayo se toma un valor promedio (1800) (Brown, 1950).

Nótese que en la expresión $10 + \sqrt[4]{\mu'}$ se debería poner $10 + 1(cp^{-0.25})\sqrt[4]{\mu'}$ para que este segundo término quede adimensional y se pueda sumar a 10 (Ec. 36).

$$\pi_v = \frac{1.03(10 + \sqrt[4]{1})}{1800} = 0.392 \frac{HP}{ft^3} = 136 \frac{W}{m^3} \quad [36]$$

Finalmente se obtiene la energía de mezclado con respecto al tiempo 48 y 36 h (Ec. 37a & 37b).

$$E_{mezclado48} = \pi_v \times V \times \Delta t = 135.96 \times 0.00018 \times 172\,800 = 4228.9 \text{ J} \quad [37a]$$

$$E_{mezclado36} = \pi_v \times V \times \Delta t = 135.96 \times 0.00018 \times 129\,600 = 3171.7 \text{ J} \quad [37b]$$

donde V significa el volumen de trabajo de la CESIM o del fermentador y Δt se refiere al tiempo de operación en segundos.

El gasto de energía eléctrica de la CESIM va desde los 0.7 hasta los 2.05 kJ, Una CESIM con separador Nafion consume el doble de electricidad que una CESIM con separador agar, lo anterior es probable que sea debido a que la CESIM con separador agar se comportó como un dispositivo bioelectroquímico sin separador; cabe mencionar que el experimento con la bacteria aislada *Caprina EHC* sólo se considera hasta las 36 h de operación, debido a que en CESIM es el tiempo en el que se alcanza la máxima producción de H₂Succ (Tabla 26). Cabe resaltar que el consumo de energía eléctrica representa en promedio sólo el 0.24% de la energía total suministrada.

El tratamiento 2 fue el que mayor alta concentración de H₂Succ global, equivalente del orden de 14.5 mmol de los experimentos de electrofermentación significativamente superior a los tratamientos 3 y 4. La membrana de agar no afectó significativamente la producción de H₂Succ en términos de masa comparado con el uso de membrana Nafion para las mismas condiciones de *A. succinogenes* y MgCO₃. Se encontró un efecto positivo en el uso de MgCO₃ vs. dónde el T1 resultó superior significativamente al T4. (Fig. 41)

Al evaluar el efecto cepa, es notable que en todos los tratamientos *A. succinogenes* se produjo más H₂Succ que con la cepa *Caprina EHC*.

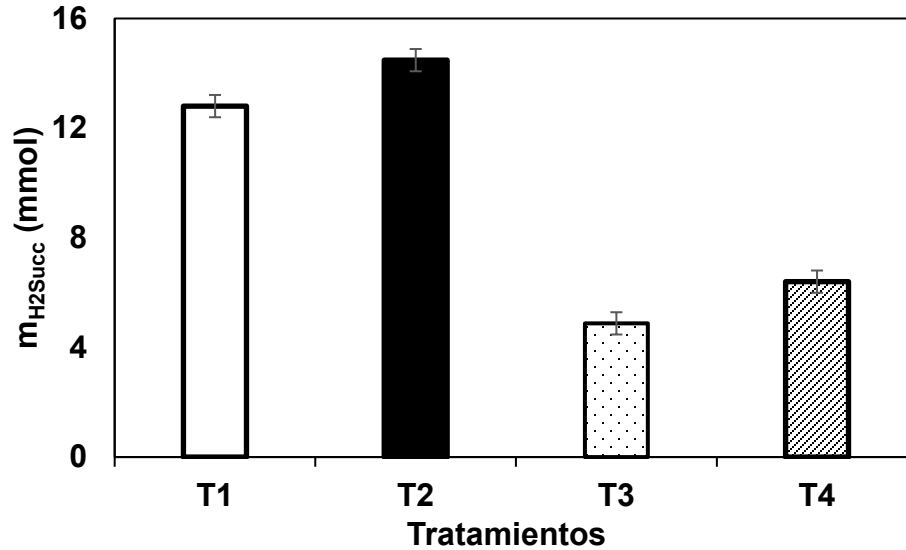


Figura 41. Masa de succínico producido mediante electrofermentación en lote. T1, cepa: *A. succinogenes*, separador: membrana de Nafion, alcalinizante: $MgCO_3$; T2, cepa: *A. succinogenes*, separador: membrana de agar, alcalinizante: $MgCO_3$; T3, cepa: *Caprina EHC*, separador: membrana de Nafion, alcalinizante: $MgCO_3$; T4, cepa: *A. succinogenes*, separador: membrana de Nafion, alcalinizante: $NaHCO_3$.

La dócima múltiple de medias de Duncan indicó que la masa de succínico producido mediante electrofermentación siguió el siguiente orden (Ec. 38).

$$T2 \underset{ns}{\approx} T1 \underset{s}{\geq} T3 \underset{ns}{\approx} T4 \quad [38]$$

donde s expresa diferencia significativa, y ns no significativa.

Los mayores rendimientos se encontraron en los tratamientos T1 y T2 y son similares significativamente. Los tratamientos T3 y T4 son no significativamente diferentes y los más pobres en rendimiento de H_2Succ . El patrón presentado en el rendimiento de H_2Succ fue muy similar al patrón obtenido para la masa de H_2Succ (Fig. 42).

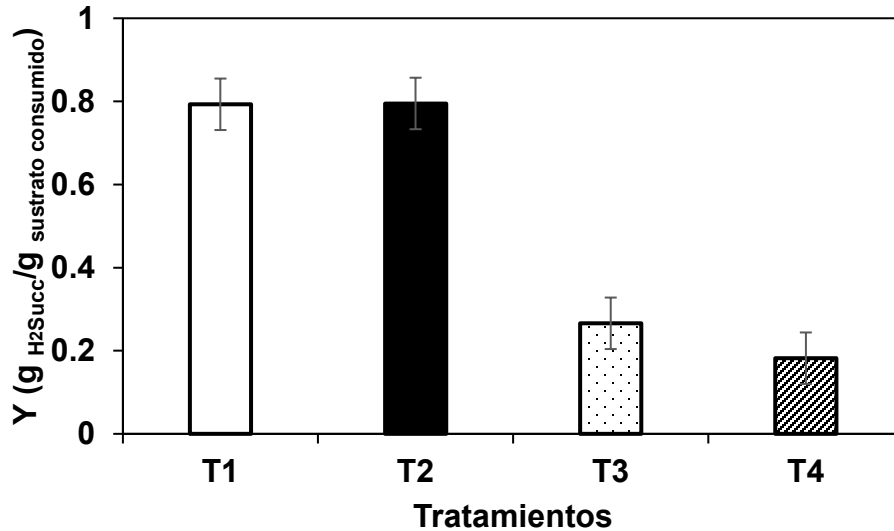


Figura 42. Rendimiento de ácido succínico. T1, cepa: *A. succinogenes*, separador: membrana de Nafion, alcalinizante: MgCO₃; T2, cepa: *A. succinogenes*, separador: membrana de agar, alcalinizante: MgCO₃; T3, cepa: *Caprina EHC*, separador: membrana de Nafion, alcalinizante: MgCO₃; T4, cepa: *A. succinogenes*, separador: membrana de Nafion, alcalinizante: NaHCO₃.

La dócima múltiple de medias de Duncan indicó que el rendimiento de H₂Succ producido mediante electrofermentación siguió el siguiente orden (Ec. 39).

$$T2 \underset{ns}{\approx} T1 \underset{s}{>} T3 \underset{ns}{\approx} T4 \quad [39]$$

donde s expresa diferencia significativa, y ns no significativa.

$\eta_{EF/FC}$ es una variable adimensional que compara la electrofermentación en cada condición contra su control fermentación convencional y ayuda a identificar que el gasto de energía de electricidad de la electrofermentación tenga un efecto neto positivo sobre la producción de H₂Succ. En ese sentido sólo dos electrofermentaciones se beneficiaron del uso de la electricidad que fueron T2 y T3. En el T2 el uso de electricidad permite mejorar la cosecha de H₂Succ y el Y de este compuesto fue en un casi 50% que la fermentación convencional. Curiosamente el T1 no superó a su control fermentación convencional y no se recomienda. Sorprendentemente, donde más influyó significativamente el dispositivo bioelectroquímico fue en donde hubo menor cantidad de H₂Succ cosechado, ahí la electricidad jugó un papel positivo la entrada de electricidad superó en más del doble a la fermentación convencional correspondiente,

a pesar de esto, la cantidad de H₂Succ y el rendimiento fueron los más pobres (Fig. 43).

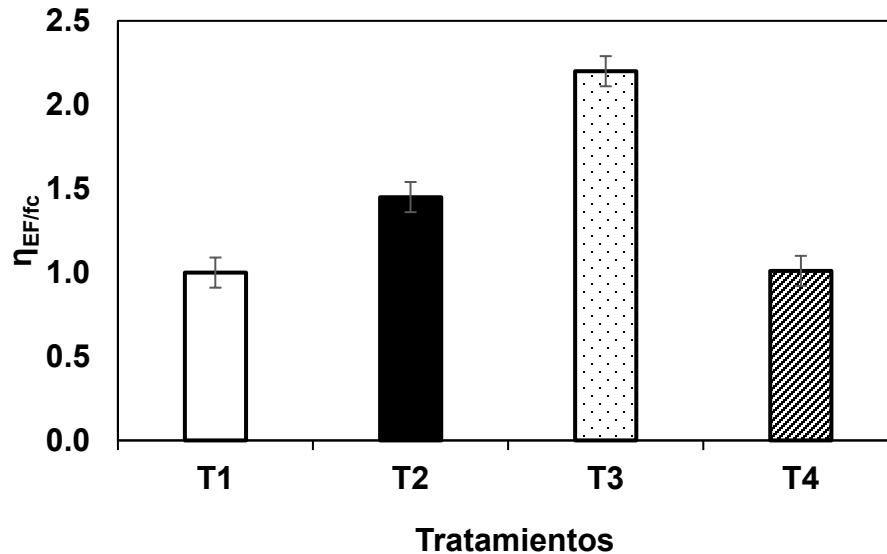


Figura 43. Índice de Poggi electrofermentación vs. fermentación convencional. T1, cepa: *A. succinogenes*, separador: membrana de Nafion, alcalinizante: MgCO₃; T2, cepa: *A. succinogenes*, separador: membrana de agar, alcalinizante: MgCO₃; T3, cepa: *Caprina EHC*, separador: membrana de Nafion, alcalinizante: MgCO₃; T4, cepa: *A. succinogenes*, separador: membrana de Nafion, alcalinizante: NaHCO₃.

La dócima múltiple de medias de Duncan indicó que el índice de Poggi electrofermentación vs. fermentación convencional se comportó en el orden que muestra la siguiente ecuación (Ec. 40).

$$T3 \underset{s}{\geq} T2 \underset{s}{\geq} T1 \underset{ns}{\approx} T4 \quad [40]$$

donde s expresa diferencia significativa, y ns no significativa.

Respecto a la ω un alta ω expresa que el sustrato se utilizó para la síntesis de H₂Succ, mientras que una baja ω significa que el sustrato fue utilizado más hacia la producción de ácidos concomitantes que para H₂Succ. El menor desvío de sustrato hacia los ácidos concomitantes se registró en el T1 y el T2, que corresponden a los tratamientos con más masa de H₂Succ producida y mayor rendimiento, mientras que *Caprina EHC* utiliza muy bien el sustrato pero lo dirige a la producción de ácidos concomitantes (Fig. 44).

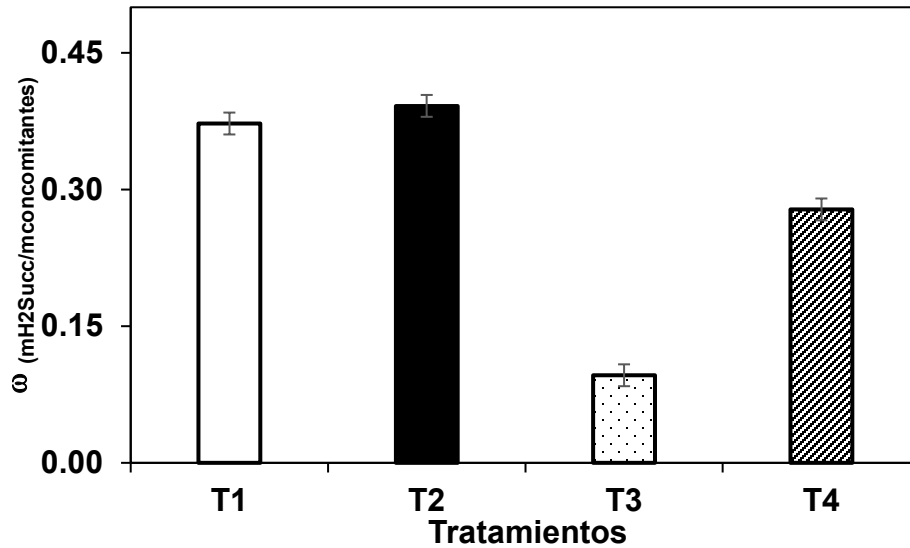


Figura 44. Relación entre ácido succínico y ácidos concomitantes. T1, cepa: *A. succinogenes*, separador: membrana de Nafion, alcalinizante: $MgCO_3$; T2, cepa: *A. succinogenes*, separador: membrana de agar, alcalinizante: $MgCO_3$; T3, cepa: *Caprina EHC*, separador: membrana de Nafion, alcalinizante: $MgCO_3$; T4, cepa: *A. succinogenes*, separador: membrana de Nafion, alcalinizante: $NaHCO_3$.

La dócima múltiple de medias de Duncan indicó que la relación entre el H_2Succ y los ácidos concomitantes se comportó en el orden que muestra la siguiente ecuación (Ec. 41).

$$T2 \underset{ns}{\approx} T1 \underset{s}{>} T4 \underset{s}{>} T3 \quad [41]$$

donde s expresa diferencia significativa, y ns no significativa.

Una CESIM a 37 °C pierde mucho calor, el balance energético reveló una pérdida del orden de 360 000 J, y la electricidad suministrada consistió sólo de alrededor de 1000 J, que fue despreciable. Este resultado sorprendente sugiere que la I&D en electrofermentaciones debe orientarse a conseguir cepas que produzcan H_2Succ en el rango psicrófilo alto (25 °C).

En la Tabla 27 se muestran los rendimientos de la electrofermentación vs. fermentación convencional de este trabajo. En los casos donde η_{EF}/η_{fc} fue >1 , entonces la electrofermentación superó a la fermentación convencional. En todos los casos se presenta un valor cercano o superior a 1; como en los experimentos donde el

separador fue una membrana de agar (T2) o el experimento fue el cultivo de *Caprina EHC* (T3). Sin embargo, en la electrofermentación con separador Nafion (T1) no superó a la fermentación convencional. Esto pudo ser debido a la indisponibilidad de los azúcares que migraron hacia el ánodo, lo cual se reflejó en un rendimiento que fue similar a la CESIM con separador agar (Tabla 27).

El \ln de ψ significa que cuanto menos negativo es el $\ln(\psi)$ entonces ψ es mayor; todo esto dada la naturaleza decimal pequeña de ψ . Puede verse que T2 tiene un $\ln(\psi)$ significativamente mayor que todos los otros tratamientos ($p < 5 \cdot 10^{-8}$).

En relación con el índice de membrana ψ (Ec. $\psi = \frac{m_{H_2Succ} (mmol) / A_{membrana} (m^2)}{\text{Costo de unidad de membrana} (\frac{US \$}{m^2})}$) este siguió el orden.

La décima múltiple de medias de Duncan indicó que el índice ψ se comportó en el orden que muestra la siguiente ecuación (Ec. 42).

$$T2 \underset{s}{\ggg} T1 \underset{s}{\geq} T4 \underset{s}{\geq} T3 \quad [42]$$

donde s expresa diferencia significativa.

El alto valor de T2 refleja sin duda el muy bajo costo de la membrana de agar en el denominador de ψ , mientras que el menor valor de ψ de T3 refleja los efectos combinados de la menor producción de H_2Succ (en el numerador) y el alto costo unitario de la membrana de Nafion (en el denominador). El detalle de los ácidos orgánicos concomitantes se puede observar en la Tabla 27. En la fig. 45 se muestran los valores en $\ln \psi$.

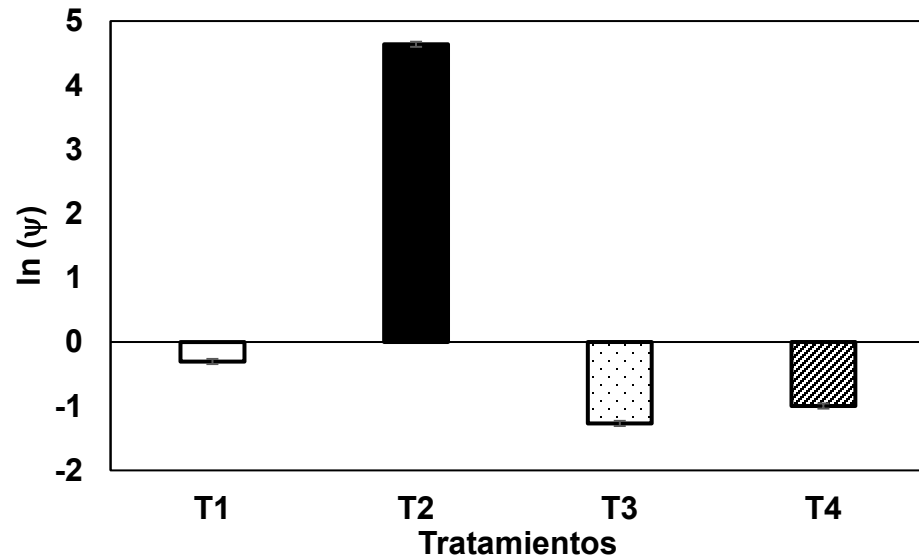


Figura 45. Índice ψ . T1, cepa: *A. succinogenes*, separador: membrana de Nafion, alcalinizante: MgCO_3 ; T2, cepa: *A. succinogenes*, separador: membrana de agar, alcalinizante: MgCO_3 ; T3, cepa: *Caprina EHC*, separador: membrana de Nafion, alcalinizante: MgCO_3 ; T4, cepa: *A. succinogenes*, separador: membrana de Nafion, alcalinizante: NaHCO_3 .

La $E_{\text{eléctrica}}$ utilizada en la electrofermentación representa 0.24% en promedio, respecto a la energía total administrada, considerando $E_{\text{calefacción}}$ y E_{mezclado} (Fig. 46).

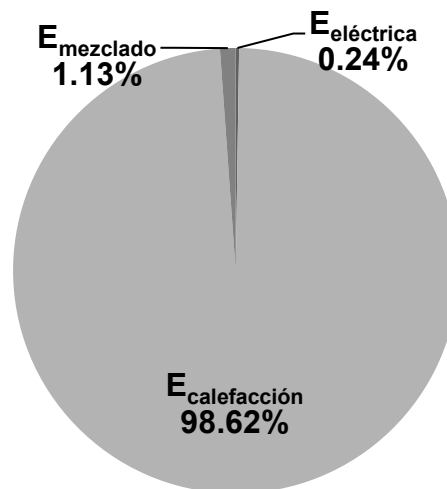


Figura 46. Energía eléctrica, calefacción y mezclado empleada en la electrofermentación.

Tabla 29. Masa de ácidos orgánicos producidos y requerimientos energéticos de la electrofermentación y la fermentación convencional de los distintos tratamientos

Tratamiento	m_{H_2Succ} (mmol) ^a ($\pm s$) ^e	$m_{concomitantes}$ (mmol) ($\pm s$)	$E_{eléctrica}$ ^a (kJ) ($\pm s$)	$E_{calefacción}$ ^b (kJ) ($\pm s$)	$E_{mezclado}$ ^c (kJ) ($\pm s$)	E_{total} ^d (kJ) ($\pm s$)	η_{EF} ^b (mmol J ⁻¹) ($\pm s$)	η_{fc} ^c (mmol J ⁻¹) ($\pm s$)	$\eta_{EF/fc}$ ^d (-) ($\pm s$)	Índice ω	ln(Índice ψ)
1. (Nf ^f -A <i>succinogenes</i> -MgCO ₃)	12.804 g (± 0.50)	34.37 (± 1.058)	0.80 (± 0.0015)	365.13 (± 18.26)	4.23 (± 0.21)	370.16 (± 22.21)	0.0346	NA	1.0 (± 0.060)	0.3724	0.74
2. (Agar-A <i>succinogenes</i> -MgCO ₃)	14.481 h (± 0.56)	36.96 (± 1.119)	0.695 (± 0.0017)	285.3 (± 18.26)	3.2 (± 0.21)	289.20 (± 17.37)	0.0500	NA	1.45 (0.0870)	0.3918	103.44
3. (Nf-Caprina EHC-MgCO ₃)	4.878 g (± 0.19)	50.77 (± 1.236)	0.92 (± 0.0012)	365.13 (± 18.26)	4.23 (± 0.21)	370.28 (± 22.20)	0.0132	NA	2.20 (0.132)	0.0961	0.28
4. (Nf- A <i>succinogenes</i> -NaHCO ₃)	6.4 g (± 0.25)	23.01 (± 0.832)	0.992 (± 0.0017)	365.13 (± 18.26)	4.23 (± 0.21)	370.35 (± 22.22)	0.0173	NA	1.01 (0.061)	0.2781	0.37
5. Control A. <i>succinogenes</i> para tratamientos 1 y 2-MgCO ₃	12.691 g (± 1.0)	42.66 (± 2.078)	NA ^e	365.13 (± 18.26)	4.23 (± 0.21)	369.36 (± 22.16)	NA	0.0346	NA	0.2975	NA
6. Control A. <i>succinogenes</i> para tratamiento 4NaHCO ₃	6.369 (± 0.25)	27.31 (± 0.942)	NA ^e	365.13 (± 18.26)	4.23 (± 0.21)	369.36 (± 22.16)	NA	0.0172	NA	0.2332	NA
7. Control Caprina EHC para tratamiento 3-MgCO ₃	2.194 (± 0.558)	29.83 (± 2.644)	NA ^e	365.13 (± 18.26)	4.23 (± 0.21)	369.36 (± 22.16)	NA	0.00599	NA	0.0736	NA

^a $E_{eléctrica}$: Energía eléctrica utilizada en la fermentación; ^b $E_{calefacción}$: Energía térmica requerida para elevar la temperatura de los electrolitos y el equipo, así como, la pérdida de calor; ^c $E_{mezclado}$: Energía utilizada en la agitación; ^d E_{total} : Suma de la energía eléctrica, energía de calefacción y la energía de mezclado. ^e NA: No Aplica. ^a m_{H_2Succ} : Masa del succínico producido en la fermentador; ^b η_{EF} : $m_{H_2Succ} \cdot EF / (E_{eléctrica} + E_{calefacción} + E_{mezclado})$; ^c η_{fc} : $m_{H_2Succ} \cdot fc / (E_{calefacción} + E_{mezclado})$; ^d $\eta_{EF/fc}$: $\eta_{EF} / \eta_{fc} \cdot E_{eléctrica}$. Energía eléctrica utilizada en la fermentación, en kJ; $E_{calefacción}$: Energía térmica requerida para elevar la temperatura de los electrolitos y el equipo, así como, la pérdida de calor, en kJ; $E_{mezclado}$: Energía utilizada en la agitación, en kJ. NA: No aplica.

Tabla 30. Detalle de masas de compuestos concomitantes obtenidas en los cuatro tratamientos y tres controles.

Tratamiento	M _{H2Succ} final (mmol) (± s)	M _{acético} final (mmol) (± s)	M _{fórmico} final (mmol) (± s)	M _{glucosa} M _{xilosa} inicial cátodo (mmol) (± s)	M _{glucosa} M _{xilosa} final ánodo (mmol) (± s)	M _{glucosa} M _{xilosa} final cátodo (mmol) (± s)
1. (Nf ^f - <i>A. succinogenes</i> - MgCO ₃)	12.80 (±0.50)	13.70 (±0.693)	20.67 (±0.426)	5.57±0.478 11.13±0.203	1.34±0.115 1.37±0.025	1.13±0.097 0.85±0.015
2. (Agar- <i>A. succinogenes</i> - MgCO ₃)	14.48 (±0.56)	16.37 (±0.828)	20.59 (±0.424)	5.57±0.478 11.13±0.203	0.97±0.084 0.59±0.011	0.98±0.085 0.59±0.011
3. (Nf- <i>Caprina EHC</i> - MgCO ₃)	4.88 (±0.19)	16.06 (±0.812)	34.71 (±0.715)	6.55±0.563 14.27±0.260	0.82±0.070 1.54±0.028	0.79±0.068 0.57±0.010
4. (Nf- <i>A. succinogenes</i> - NaHCO ₃)	6.4 (±0.25)	7.28 (±0.368)	15.73 (±0.324)	7.86±0.675 13.13±0.239	ND	0.84±0.072 0.95±0.017
5. Control <i>A. succinogenes</i> para tratamientos 1 y 2- MgCO ₃	12.691 (±1.0)	22.22 (±2.642)	20.44 (±1.677)	5.57±0.478 11.13±0.203	0.06±0.005 0.06±0.001	
6. Control <i>A. succinogenes</i> para tratamiento 4NaHCO ₃	6.369 (±0.25)	10.89 (±0.550)	16.42 (±0.338)	6.99±0.60 15.22±0.278	ND	0.08±0.007 0.22±0.004
7. Control <i>Caprina EHC</i> para tratamiento 3-MgCO ₃	2.194 (±0.558)	15.04 (±5.012)	14.79 (±1.979)	7.86±0.675 13.13±0.239	0.81±0.069 0.89±0.016	

ND: No determinado.

7. CONCLUSIÓN

Hidrolizado de FORSU

- La hidrólisis ácida de FORSU se optimizó por paso ascendente y permitió obtener hasta 28.3 g L^{-1} de azúcares reductores, resultado que está en el lado alto de lo reportado para FORSU.
- La remoción de compuestos fenólicos por cascarón de huevo en polvo fue más efectiva a pH ácidos que a alcalinos. Cerca del 20% de los compuestos fenólicos fueron removidos debido al cascarón de huevo en polvo a pH 3.
- La cinética de adsorción de compuestos fenólicos experimental se explica mejor por un modelo de segundo orden en q .
- La destoxificación combinada 'sobre-adición de cal' y adsorción por cascarón de huevo en polvo, logra remover cerca del 30% de compuestos fenólicos a pH 6 y 9.
- Mediante la destoxificación combinada sobre-adición de cal + CHP se remueven en mayor medida el HMF y el ácido levulínico en un 25 y 70%, respectivamente, mientras que a pH ácidos la remoción de estos compuestos debida a la adsorción por CHP es nula.
- El cascarón de huevo en polvo no remueve los azúcares reductores del hidrolizado de FORSU.
- Respecto a isothermas de adsorción del sistema fenoles-CHP a pH 3, el modelo lineal ajustó ligeramente mejor que el modelo de Freundlich. El exponente Freundlich n resultó n mejor que 1, lo que en algunos trabajos de la literatura internacional se asocia a adsorción menos favorable. Esto puede ser congruente con las remociones de fenol pobres obtenidas con CHP.

Caprina EHC

- Se aisló una bacteria productora de ácido succínico llamada *Caprina EHC* y se identificó como *E. coli* (99.93% de similitud).
- La bacteria *Caprina EHC* fue productora de ácido succínico, y concomitantes acético, fórmico e hidrógeno a partir de hidrolizado de FORSU.

Electrofermentación

- Los balances de energía de las CESIM indicaron que, contra lo esperado, los consumos de energía siguieron el orden

$E_{\text{calefacción}} \gg E_{\text{mezclado}} \gg E_{\text{eléctrica}}$.

La $E_{\text{eléctrica}}$ consumida fue tan sólo el 0.24% del total de energía requerida para la operación. Este patrón fue generalmente independiente de la cepa utilizada en las CESIM.

Dentro de la energía de calefacción, el término preponderante fue la pérdida de calor del dispositivo al ambiente.

- *A. succinogenes* es capaz de crecer a partir de hidrolizado de FORSU en una CESIM. El cátodo de CESIM con voltaje aplicado -1.8 V se colonizó en mayor cantidad por *A. succinogenes* que un cátodo sin flujo de corriente.
- La producción de H₂Succ (en términos de masa por tratamiento) en una CESIM inoculada con *A. succinogenes* utilizando un separador de agar (T2) superó significativamente (1.5 veces) la fermentación convencional de acuerdo con el índice $\eta_{EF/FC}$ de Poggi. Sin embargo, la producción de H₂Succ en una CESIM colonizada por *A. succinogenes* utilizando un separador de Nafion (T1) no superó significativamente la fermentación convencional correspondiente.
- Las membranas Nafion y agar no lograron impedir la migración de los electrolitos como azúcares y ácidos orgánicos del cátodo hacia el ánodo a pH cercanos a neutro en las CESIM. En el caso de membrana de agar también se observó migración de los microorganismos al ánodo de la CESIM.
- La CESIM inoculada con cultivo de *Caprina EHC* (T3) superó significativamente (2.2 veces) la producción de H₂Succ comparado con la fermentación convencional correspondiente. Sin embargo, la producción y rendimiento de H₂Succ fue muy pobre en ambos casos.
- Los tratamientos T1 y T2 (alcalinizante: MgCO₃ y cepa: *A. succinogenes*) fueron significativamente mayores productores de H₂Succ (masa por tratamiento) y mostraron rendimientos de H₂Succ significativamente más elevados con respecto a los tratamientos T3 (alcalinizante: MgCO₃ y cepa: *Caprina EHC*) y T4 (alcalinizante: NaHCO₃ y cepa: *A. succinogenes*) ($p < 0.01$). Además, en la

CESIM equipada con membrana de agar T2 se obtuvo el mayor índice de membrana ψ ($\psi = \frac{m_{H_2Succ} (mmol) / A_{membrana} (m^2)}{\text{Costo de unidad de membrana} (\frac{\$US}{m^2})}$) entre todos los tratamientos

($p < 0.01$).

- Respecto a productos concomitantes y el índice ω ($\omega = \frac{m_{H_2Succ}}{m_{\text{ácido acético}} + m_{\text{ácido fórmico}}}$) los tratamientos T1 y T2 con casi 30% de H₂Succ sobre los compuestos concomitantes. T3 (cepa: *Caprina EHC* y separador: Nafion) tuvo la electrofermentación más desviada hacia la producción de compuestos concomitantes con 9% y significativamente menor que todos los tratamientos restantes.
- En relación con el índice de membrana ψ ($\psi = \frac{m_{H_2Succ} (mmol) / A_{membrana} (m^2)}{\text{Costo de unidad de membrana} (\frac{\$US}{m^2})}$), el tratamiento T2 fue el más alto valor, lo cual refleja sin duda el muy bajo costo de la membrana de agar en el denominador de ψ , mientras que el menor valor de ψ de T3 refleja los efectos combinados de la menor producción de H₂Succ (en el numerador) y el alto costo unitario de la membrana de Nafion (en el denominador).

Análisis de hipótesis

El análisis de las hipótesis planteadas arroja lo siguiente:

La hipótesis general se confirmó al demostrar que es posible la producción de H₂Succ por *A. succinogenes* a partir de hidrolizado de FORSU mediante una CESIM.

Con respecto a las hipótesis particulares,

La hipótesis 1 se confirma debido a que se obtuvo un hidrolizado de FORSU rico en azúcares.

La hipótesis 2 se valida aunque con la salvedad de que el CHP no remueve más allá del 30% de inhibidores fenólicos, su destoxificación es baja-moderada.

La hipótesis 3 se confirma, se demostró que *A. succinogenes* crece y produce H₂Succ a partir de hidrolizado de FORSU en una CESIM.

La hipótesis 4 en principio no es válida, aunque conviene discutir algunas ambigüedades:

La membrana de agar desafortunadamente no se desempeña como buen separador porque deja pasar H_2Succ , compuestos concomitantes, y microorganismo *A. succinogenes* al ánodo. Sin embargo, en la CESIM equipada con agar (T2) se obtuvo los mayores rendimientos y producción de H_2Succ , así como la demostración que la electrofermentación fue más eficiente que la fermentación convencional. Además, se demostró que el índice de membrana ψ fue el mayor entre todos los tratamientos ($p < 0.01$).

La hipótesis 5 se valida: se logró aislar un microorganismo productor de H_2Succ a partir de muestra de rumen de caprino.

La hipótesis 6 se confirma, el microorganismo aislado tuvo una mejor producción de H_2Succ en una electrofermentación que en una fermentación convencional.

8. REFERENCIAS

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (1984). Official methods of analysis. 14th edition. AOAC, Arlington, USA.
- Awate, B., Steidl, R. J., Hamlischer, T., & Reguera, T. (2017). Stimulation of electro-fermentation in single-chamber microbial electrolysis cells driven by genetically engineered anode biofilms. *Journal of Power Sources*, 356: 510-518.
- Azizian S. (2004) Kinetic models of sorption: A theoretical analysis. *Journal of Colloid and Interface Science*. 276: 47-52.
- Bahcegul, E., Tatli, E., Haykir, N. I., Apaydin, S., & Bakir, U. (2011). Selecting the right blood glucose monitor for the determination of glucose during the enzymatic hydrolysis of corncob pretreated with different methods. *Bioresource Technology*, 102(20): 9646-9652.
- Bajracharya, S., ter Heijne, A., Benetton, X. D., Vanbroekhoven, K., Buisman, C. J., Strik, D. P., & Pant, D. (2015). Carbon dioxide reduction by mixed and pure cultures in microbial electrosynthesis using an assembly of graphite felt and stainless steel as a cathode. *Bioresource Technology*, 195: 14-24.
- Battle-Vilanova, P., Ganigué, R., Raió-Pujol, S., Bañeras, L., Jiménez, G., Higaldo, M. Balaguer, M.D. Colprim, J. & Puig, S. (2017). Microbial electrosynthesis of butyrate from carbon dioxide: Production and extraction. *Bioelectrochemistry*. 117:57-64.
- Beauprez, J.J., De Mey, M., & Soetaert, W.K. (2010). Microbial succinic acid production: natural versus metabolic engineered producers. *Process Biochemistry*, 45(7): 1103-1114.
- Benjelloun, H., Rochex, A., Lecouturier, D., Dechemi, S., & Lebeault, J.M. (2005). An on-line technique for monitoring propionic acid fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(3): 316-321.
- Berríos-Rivera, S. J., Bennett, G. N., & San, K. Y. (2002). Metabolic engineering of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. *Metabolic Engineering*, 4(3): 217-229.
- Binns, M., Vlysidis, A., Webb, C., Theodoropoulos, C., de Atauri, P., & Cascante, M. (2011). Glycerol metabolic conversion to succinic acid using *Actinobacillus succinogenes*. a metabolic network-based analysis. *Computer Aided Chemical Engineering*, 29: 1421-1425.
- © Bioamber inc. BioAmber Products | Bio-Succinic Acid (Bio-SA™), Bio-1,4-Butanediol (Bio-BDO), Bio-Disodium Succinate (Bio-DSS™). Fecha de 22 de Agosto 2016 (https://www.bio-amber.com/bioamber/en/products#succinic_acid).
- Blanco-Mendoza, R.H., Poggi-Varaldo, H.M., Hernández-Vera, R., Hernández-Correa, E; Rinderknecht-Seijas, N., & Camacho-Pérez, B. (2017). Evaluation of cathodic assemblages and monitoring devices for a bioelectrochemical slurry reactor treating a soil polluted with lindane. 4th *International Symposium on Remediation and Sustainable Environmental Technologies*, Battelle, Miami, FL, 22-25 May 2017. Paper 584, pp. 1-25.
- Bryant, M.P. & Small, N. (1956). Characteristics of two new genera of anaerobic curved rods isolated from the rumen of cattle. *Journal of Bacteriology*. 72(1):22-26.
- Bryant, M.P., Bouma, C., & Chu, H. (1958). *Bacteroides ruminicola* n. sp. and the new species *Succinomonas amylolytica*. Species of succinic acid producing anaerobic bacteria by the bovine rumen. *Journal of Bacteriology*. 76: 15-23.
- Brink, H. G., & Nicol, W. (2014). Succinic acid production with *Actinobacillus succinogenes*: rate and yield analysis of chemostat and biofilm cultures. *Microbial Cell Factories*, 13(1): 111.
- Brown, G.G. (1950) Unit operations. *John Wiley & Sons, Inc.* Newyork, USA. Pp 510-560.
- Butler, C. S., & Lovley, D. R. (2016). How to sustainably feed a microbe: Strategies for biological production of carbon-based commodities with renewable electricity. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1-6. Article 1879.
- Camacho-Pérez, B., Ríos-Leal, E., Solorza-Feria, O., Vazquez-Landaverde, P., Barrera-Cortés, J., Ponce-Noyola, M. T., Garcia-Mena, J., Rinderknecht-Seijas, N., & Poggi-Varaldo, H. M. (2013). Performance of an electrobiochemical slurry reactor for the treatment of a soil contaminated with lindane. *Journal of New Materials for Electrochemical Systems*, 16(3): 217-228.
- Cao, X., Huang, X., Liang, P., Xiao, K., Zhou, Y., Zhang, X., & Logan, B. E. (2009). A new method for water desalination using microbial desalination cells. *Environmental Science & Technology*, 43(18), 7148-7152.

- Carvalho, M., Matos, M., Roca, C., & Reis, M. A. (2014a). Succinic acid production from glycerol by *Actinobacillus succinogenes* using dimethylsulfoxide as electron acceptor. *New biotechnology*, 31(1): 133-139.
- Carvalho, M., Roca, C., & Reis, M. A. (2014b). Carob pod water extracts as feedstock for succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* 130Z. *Bioresource Technology*, 170, 491-498.
- Chapra, S.C. & Canale, R.P. (2015). Numerical methods for engineers. 7th edition. *McGraw-Hill Education*. New York, USA.
- Chaudhuri, S. K., & Lovley, D. R. (2003). Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnology*, 21(10): 1229-1232.
- Chen, K., Jiang, M., Wei, P., Yao, J., & Wu, H. (2010a). Succinic acid production from acid hydrolysate of corn fiber by *Actinobacillus succinogenes*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(2): 477-485.
- Chen, K., Zhang, H., Miao, Y., Jiang, M., & Chen, J. (2010b). Succinic acid production from enzymatic hydrolysate of sake lees using *Actinobacillus succinogenes* 130Z. *Enzyme and Microbial Technology*, 47(5): 236-240.
- Chen, K. Q., Li, J., Ma, J. F., Jiang, M., Wei, P., Liu, Z. M., & Ying, H. J. (2011). Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* using hydrolysates of spent yeast cells and corn fiber. *Bioresource Technology*, 102(2): 1704-1708.
- Choi, O., Kim, T., Woo, H. M., & Um, Y. (2014). Electricity-driven metabolic shift through direct electron uptake by electroactive heterotroph *Clostridium pasteurianum*. *Scientific Reports*, 4: 1-10. 6961.
- Corona-González, R. I., Borjes, A., González-Álvarez, V., & Pelayo-Ortiz, C. (2008). Kinetic study of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* ZT-130. *Process Biochemistry*, 43(10): 1047-1053.
- Daraei, H., Mittal, A., Noorisepehr, M., & Daraei, F. (2013). Kinetic and equilibrium studies of adsorptive removal of phenol onto eggshell waste. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(7): 4603-4611.
- Davis, C.P., Cleven, D., Brown, J. & Balish, E. (1976). *Anaerobiospirillum*, a new genus of spiral-shaped bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 26: 498-504.
- De Angelis, G. Medeghini, L. Conte, A. M., & Mignardi S. (2017). Recycling of eggshell waste into low-cost adsorbent for Ni removal from wastewater. *Journal of Cleaner Production*. 164: 1497-1506.
- Escamilla-Alvarado, C. (2009). Proceso integrado para producción de energía y enzimas a partir de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos. Departamento de Biotecnología y bioingeniería, CINVESTAV. CDMX, México.
- Felder, R.M. Rousseau, R.W. (2005) Elementary principles of chemical processes. Third edition. *John Wiley & Son, Inc.* USA.
- Flores-Delgadillo, L. & Alcalahá-Martínez, J.R. (2010). Manual de procedimientos analíticos. Laboratorio de física de suelos. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Geología. pp. 5-6.
- Freire, M.N. & Holanda, J.N.F. (2006). Characterization of avian eggshell waste aiming its use in a ceramic wall tile paste. *Ceramica* 52:240-244.
- Fu, L., Gao, X., Yang, Y., Aiyong, F., Hao, H., & Gao, C. (2014). Preparation of succinic acid using bipolar membrane electrodialysis. *Separation and Purification Technology*, 127: 212-218.
- Ganigué, R., Puig, S., Batlle-Vilanova, P., Balaguer, M. D., & Colprim, J. (2015). "Microbial electrosynthesis of butyrate from carbon dioxide". *Chemical Communications*, 51(15): 3235-3238.
- Ghanavati, H., Nahvi, I., & Karimi, K. (2015). Organic fraction of municipal solid waste as a suitable feedstock for the production of lipid by oleaginous yeast *Cryptococcus aerius*. *Waste Management*, 38: 141-148.
- Giddings, C. G., Nevin, K. P., Woodward, T., Lovley, D. R., & Butler, C. S. (2015). Simplifying microbial electrosynthesis reactor design. *Frontiers in microbiology*, 6: 1-6 .Article 468.
- Graham, H. D. (1992). Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(5): 801-805.
- Guettler, M. V., Jain, M. K., & Rumler, D. (1996). U.S. Patent No. 5,573,931. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Guettler, M. V., Rumler, D., & Jain, M. K. (1999). *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1): 207-216.

- Gildemyn, S., Verbeeck, K., Slabbinck, R., Andersen, S. J., PrévotEAU, A., & Rabaey, K. (2015). Integrated Production, Extraction, and Concentration of Acetic Acid from CO₂ through Microbial Electrosynthesis. *Environmental Science & Technology Letters*, 2(11): 325-328.
- Halliday, C.S. & Matthews, D.B. (1983). Some electrochemical and photoelectrochemical properties of 3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine (neutral red) in aqueous solution. *Australian Journal of Chemistry*. 36(3): 507-516.
- Hamelers H. V. M., Sleutels T.H.J.A., Jeremiasse A.W., Post J.W., Strik D.P.B.T.B. & Rozendal R.A. (2009). In: K. Rabaey, L. T. Angenent, U. Schröder, J. Keller (Eds.). (2009). Bioelectrochemical systems: From extracellular electron transfer to biotechnological application, *IWA Publishing*, London, UK.
- Hamelers, H. V., Ter Heijne, A., Sleutels, T. H., Jeremiasse, A. W., Strik, D. P., & Buisman, C. J. (2010). New applications and performance of bioelectrochemical systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6): 1673-1685.
- Harrington, T. D., Mohamed, A., Tran, V. N., Biria, S., Gargouri, M., Park, J. J., Gang D.R., & Beyenal, H. (2015). Neutral red-mediated microbial electrosynthesis by *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Zymomonas mobilis*. *Bioresource Technology*, 195: 57-65.
- Hepburn, A. J. (2011). The synthesis of succinic acid and its extraction from fermentation broth using a two-phase partitioning bioreactor. Department of Chemical Engineering. Queen's University. Canada, Ontario.
- Hepburn, A. J., & Daugulis, A. J. (2012). The use of CO₂ for reversible pH shifting, and the removal of succinic acid in a polymer-based two-phase partitioning bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(1), 42-50.
- Hernández-Correa, E., Poggi-Varaldo, H. M., Ponce-Noyola, Ma. T., Solorza-Feria, O., Romero-Cedillo, L., Ríos-Leal. (2017a). Production of Value-Added products and Commodities by Electrofermentation and its Integration to Biorefineries. Paper 580, pp. 1-25. Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies—2017. Fourth International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies (Miami, FL; May 2017). ©2017 Battelle Memorial Institute, Columbus, OH, www.battelle.org/biosymp.
- Hernández-Correa, E., Poggi-Varaldo, H. M., Ponce-Noyola, Ma. T., Solorza-Feria, O., Romero-Cedillo, L., Ríos-Leal, E., Hernández-Flores, G. (2017b). Powdered eggshell waste: adsorbent of inhibitors in hydrolysate of OFMSW. *Segundo Congreso Internacional de Energía 2017*. CDMX, México. 04-08 septiembre 2017. Paper 119, pp. 1-6.
- Hernández-Flores G. (2015). Producción de bioelectricidad usando bacterias electroquímicamente activas reductoras de Fe (III), acopladas a una matriz de escamas de grafito como material anódico, dentro de una celda de combustible unicameral. Biotecnología y bioingeniería, CINVESTAV. CDMX, México.
- Henderson, C., Stewart, C. S., & Nekrep, F. V. (1981). The effect of monensin on pure and mixed cultures of rumen bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 51(1): 159-169.
- Hickner, M. A., Ghassemi, H., Kim, Y. S., Einsla, B. R., & McGrath, J. E. (2004). Alternative polymer systems for proton exchange membranes (PEMs). *Chemical Reviews*, 104(10): 4587-4612.
- Ho Y.S. (1995) Adsorption of heavy metals from waste stream by peat. Dissertation for the Doctoral Degree. Birmingham: University of Birmingham, Reino Unido.
- Inci, Í. (2007). Linear solvation energy relationship modeling and kinetic studies on reactive extraction of succinic acid by tridodecylamine dissolved in MIBK. *Biotechnology Progress*, 23(5): 1171-1179.
- Ingole, V.H., Hussein, K., Kashale, A. A., Ghule, K., Vuherer, T., Kokol, V., Chang, J. Y., Ling, Y. C., Vinchurkar, A., Dhakal, H. N., Ghule, A.V. (2017). Ultrasound-assisted green economic synthesis of hydroxyapatite nanoparticles using eggshell biowaste and study of mechanical and biological properties for orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* .105(11): 2935-2947.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2011). Residuos sólidos urbanos. Censo nacional de gobiernos municipales y delegacionales 2011. Tabulados básicos. Fecha de actualización: 28 de febrero de 2014.
- Jame, R., Viera, V., Lakatoš, B. Varečka, L. (2011). The hydrogen production by anaerobic bacteria grown on glucose and glycerol. *Acta Chimica Slovaca*. 4(2): 145-157.
- Jansen, M. L., & van Gulik, W. M. (2014). Towards large scale fermentative production of succinic acid. *Current Opinion in Biotechnology*, 30: 190-197.

- Jansen, R. (2016). Integrated production and extraction of acetic acid from CO₂ using microbial electrosynthesis: creating a reactor platform. Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University. Ghent, Belgium.
- Jiang, M., Xu, R., Xi, Y. L., Zhang, J. H., Dai, W. Y., Wan, Y. J., Chen K. Q. & Wei, P. (2013). Succinic acid production from cellobiose by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 135: 469-474.
- Kato S., Hashimoto K. & Watanabe K. (2012). "Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi) conductive iron-oxide minerals". *Environmental Microbiology*, 14(7): 1646-1654.
- Kim, N. J., Chang, Y. K., Lee, S. Y., Kim, M. I., Shang, L., Chang Y. L. & Chang, H. N. (2009). Continuous production of succinic acid using an external membrane cell recycle system. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(11): 1369-73.
- Kisidayova, S., Laukova, A., Jalc, D. (2009). Comparison of nisin and monensin effects on ciliate and selected bacterial populations in artificial rumen. *Folia Microbiologica (Praha)* 54(6): 527–532.
- Kloetzer, L., Caçaval, D., & Galaction, A. I. (2013). Influence of solvent polarity on interfacial mechanism and efficiency of succinic acid reactive extraction with tri-n-octylamine. *Chemical Engineering Communications*, 200(5): 701-717.
- Koner, S., Pal, A. & Adak, A. (2013). Adsorption of 2,4-D herbicide from water environment on modified silica gel factory waste. *Water Environment Research*. 85(11): 2147-2156.
- Kuhnert, P., Scholten, E., Haefner, S., Mayor, D., & Frey, J. (2010). *Basfia succiniciproducens* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Pasteurellaceae isolated from bovine rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1): 44-50.
- Lalaurette, E., Thammannagowda, S., Mohagheghi, A., Maness, P. C., & Logan, B. E. (2009). "Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis". *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(15): 6201-6210.
- Lee, P., Lee, S., Hong, S., & Chang, H. (2002). Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5): 663-668.
- Lee, P. C., Lee, S. Y., & Chang, H. N. (2008). Cell recycled culture of succinic acid-producing *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using an internal membrane filtration system. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(7): 1252–1256.
- Li, J., Ng, D.H.L., Ma, R, Zuo, M., & Song, P. (2017). Eggshell membrane-derived MgFe₂O₄ for pharmaceutical antibiotics removal and recovery from water. *Chemical Engineering Research and Design*. 126: 123-133.
- Lin, J.X., Zhan, S.L., Fang, M.H. & Qian, X. D. (2007). The adsorption of dyes from aqueous solution using diatomite. *Journal of Porous Materials*. 14(4): 449-455.
- Liu, Y. P., Zheng, P., Sun, Z. H., Ni, Y., Dong, J. J., & Zhu, L. L. (2008). Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 99(6): 1736-1742.
- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete W., & Rabaey, K. (2006). Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environmental Science & Technology*, 40(17): 5181-5192.
- Logan, B. E., & Regan, J. M. (2006). Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in Microbiology*, 14(12): 512-518.
- Machado, C. M. L., Brait, A. H., Brait, G. R., Rodrigues, E. A., & Bueno, C. E. D. S. (2014). Analysis of active chlorine releasing, and pH of sodium hypochlorite solutions used in Endodontics. *Revista Sul-Brasileira de Odontologia (Online)*, 11(3): 252-259.
- McKinlay, J.B. & Zeikus, J.C., (2004). Extracellular iron reduction is mediated in part by neutral red and hydrogenase in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 70: 3467-3474.
- Margraf, T., Karnopp, A. R., Rosso, N. D., & Granato, D. (2015). Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. *Journal of Food Science*, 80(11): C2397-C2403.
- Martinez, A., Rodriguez, M. E., Wells, M. L., York, S. W., Preston, J. F., & Ingram, L. O. (2001). Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. *Biotechnology Progress*, 17(2): 287-293.
- May, H. D., Evans, P. J., & LaBelle, E. V. (2016). "The bioelectrosynthesis of acetate". *Current Opinion in Biotechnology*, 42: 225-233.

- Meynial-Salles, I., Dorotyn, S., & Soucaille, P. (2008). A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer, and productivity. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(1): 129-135.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3): 426-428.
- Montgomery, D.C. (2009) Design and analysis of experiments. *John Wiley & Sons, Inc.* 7th edition. New York, USA.
- Natrass, L., Aylott, M., & Higson, A. (2013). NNFCC Renewable chemicals factsheet: Succinic acid. <http://www.nnfcc.co.uk/publications/nnfcc-renewable-chemicals-factsheet-succinic-acid>. Consultada en Agosto 2016.
- Netthisinghe, A.M.P., Cook, K.L., Rice, C., Gilfillen, R.A. & Sistani K.R. (2013). Soil nutrients, bacteria populations, and veterinary pharmaceuticals across a backgroundind beff feedlot. *Journal of Environmental Quality*. 42(2): 532-544.
- Oh, I. J., Kim, D. H., Oh, E. K., Lee, S. Y., & Lee, J. (2009): Optimization and scale-up of succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens* LPK7. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(2): 167-171.
- Oke, I. A., Olarinoye, N. O., & Adewusi, S. R. A. (2008). Adsorption kinetics for arsenic removal from aqueous solutions by untreated powdered eggshell. *Adsorption*, 14(1): 73-83.
- Okino, S., Noburyu, R., Suda, M., Jojima, T., Inui, M., & Yukawa, H. (2008). An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(3), 459-464.
- Orjuela, A., Yanez, A. J., Peereboom, L., Lira, C. T., & Miller, D. J. (2011). A novel process for recovery of fermentation-derived succinic acid. *Separation and Purification Technology*, 83: 31-37.
- Park, D. H., Laivenieks, M., Guettler, M. V., Jain, M. K., & Zeikus, J. G. (1999). Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron donor for growth and metabolite production. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7): 2912-2917.
- Pateraki, C., Patsalou, M., Vlysidis, A., Kopsahelis, N., Webb, C., Koutinas, A. A., & Koutinas, M. (2016). *Actinobacillus succinogenes*: Advances on succinic acid production and prospects for development of integrated biorefineries. *Biochemical Engineering Journal*, 112: 285-303.
- Perez-Heredia, C., González-Fernández, N., Pérez-González, E., Moreira-Rubio, A. Salazar-Gómez, E. (2017) Calculations for the sterilization by direct injection of steam of the culture medium used in the production of HeberNem. *Tecnología Química*. 37(3): 492-512.
- Pinazo, J. M., Domine, M. E., Parvulescu, V., & Petru, F. (2015). Sustainability metrics for succinic acid production: A comparison between biomass-based and petrochemical routes. *Catalysis Today*, 239: 17-24.
- Playne, M. J. (1985). Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic and succinic acids in fermentation liquids by gas chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(8): 638-644.
- Qiu, R. Yin, S., Zhang, X., Xia, J., Xu, X., & Luo, S. (2009). Synthesis and structure of air-stable cationic organobismuth complex and its use as a highly efficient catalyst for direct diastereoselective Mannich reaction in water. *The Royal Society of Chemistry*. Supplementary Material (ESI) for Chemical Communications. pp. 1-7.
- Quina, M. J., Soares, M. A. R. & Quinta-Ferreira R. (2017). Applications of industrial eggshell as a valuable anthropogenic resource. *Resources, Conservation and Recycling*. 123: 176-186.
- Rabaey K. & Rozendal R.A. (2010). "Microbial electrosynthesis—revisiting the electrical route for microbial production". *Nature Reviews Microbiology*, 8(10): 706-716.
- Rohsenow, W.M., Hartnett, J.P., Cho, Y.I. (1998). Handbook of heat transfer. Third edition, *McGraw-Hill*. USA.
- Romero-Cedillo, L. (2015). "Aplicación del principio de cascada a la corriente residual de la producción de holocelulasas, dentro de un proceso de biorrefinería de sólidos urbanos, para la obtención de bioenergía, enzimas y sacarificados". Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV. CDMX, México.
- Rozendal R.A., Hamelers H.V.M., Euverink G.J.W., Metz S.J. & Buismana C.J.N. (2006). "Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*; 31:1632–40.

- Salem, A. Z. M., Ammar, H., Lopez, S., Gohar, Y. M., & González, J. S. (2011). Sensitivity of ruminal bacteria isolates of sheep, cattle and buffalo to some heavy metals. *Animal Feed Science and Technology*, 163(2): 143-149.
- Salvachúa, D., Mohagheghi, A., Smith, H., Bradfield, M. F., Nicol, W., Black, B. A., Bidy, M.J., Dowe, N. & Beckham, G. T. (2016). Succinic acid production on xylose-enriched biorefinery streams by *Actinobacillus succinogenes* in batch fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1): 1.
- Sasaki, K., Tsuge, Y., Sasaki, D., & Kondo, A. (2014). Increase in lactate yield by growing *Corynebacterium glutamicum* in a bioelectrochemical reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(5): 598-601.
- Saito N. & Nei M. (1987). The Neighbor-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4): 406-425.
- Sharma M., Bajracharya S., Gildemyn S., Patil S.A., Alvarez-Gallego Y., Pant D., Rabaey K. & Dominguez-Benetton, X. (2014). "A critical revisit of the key parameters used to describe microbial electrochemical systems". *Electrochimica Acta*, 140: 191-208.
- Sharma, P. & Melkania, U. (2017). Biosurfactant-enhanced hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste using co-culture of *E. coli* and *Enterobacter aerogenes*. *Bioresource Technology*. 243: 566-572.
- Shen, N., Wang, Q., Qin, Y., Zhu, J., Zhu, Q., Mi, H., Wei Y. & Huang, R. (2014). Optimization of succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes* GXAS137 using response surface methodology (RSM). *Food Science and Biotechnology*, 23(6): 1911-1919.
- Sheng, Z., Tingting, B., Xuanying, C., Xiangxiang, W., & Mengdi, L. (2016). Separation of Succinic Acid from Aqueous Solution by Macroporous Resin Adsorption. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 61(2): 856-864.
- Silva, C.E.F. & Bertucco, A. (2017). Diluted acid hydrolysis of microbial biomass for bioethanol production: an accurate kinetic model of biomass solubilization, sugars hydrolysis and nitrogen/ash. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*. 122(2): 1095-1114.
- Silverstein, R. A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R. R., Boyette, M. D., & Osborne, J. (2007). A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology*, 98(16): 3000-3011.
- Song, H., & Lee, S. Y. (2006). Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3): 352-361.
- Sosa, P. A., Roca, C., & Velizarov, S. (2016). Membrane assisted recovery and purification of bio-based succinic acid for improved process sustainability. *Journal of Membrane Science*, 501, 236-247.
- Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. (1991) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley, New York, USA.
- Steinbusch, K. J., Hamelers, H. V., Schaap, J. D., Kampman, C., & Buisman, C. J. (2010). "Bioelectrochemical ethanol production through mediated acetate reduction by mixed cultures". *Environmental Science & Technology*, 44(1): 513-517.
- Strik, D. P., Timmers, R. A., Helder, M., Steinbusch, K. J., Hamelers, H. V., & Buisman, C. J. (2011). Microbial solar cells: applying photosynthetic and electrochemically active organisms. *Trends in Biotechnology*, 29(1): 41-49.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tarkow, H., & Feist, W. C. (1969). A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid ammonia. *Advances in Chemistry*. 93(12). 197-218.
- Tippens P.E. (2011) Física: Conceptos y aplicaciones. *McGraw-Hill Education*. septima ed. pp. 372.
- Tsai, S.C. & Juang, K. W. (2000). Comparison of linear and nonlinear forms of isotherm models for strontium sorption on a sodium bentonite. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 243(3). 741-746.
- Tsai, W.T., Yang, J.M., Lai, C.W., Cheng, Y.H., Lin, C.C. and Yeh, C.W. (2006). Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane. *Bioresource Technology*. 97: 488-493.
- Urbance, S. E., Pometto III, A. L., DiSpirito, A. A., & Denli, Y. (2004). Evaluation of succinic acid continuous and repeat-batch biofilm fermentation by *Actinobacillus succinogenes* using plastic composite support bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6): 664-670.

- Van der Werf, M.J., Guettler, M.V., Jain, M.K. & Zeikus, J.G. (1997) Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. *Archives of Microbiology*, 167: 332-342.
- van Heerden, C. D., & Nicol, W. (2013). Continuous succinic acid fermentation by *Actinobacillus succinogenes*. *Biochemical Engineering Journal*, 73: 5-11.
- Van Eerten-Jansen, M. C., Veldhoen, A. B., Plugge, C. M., Stams, A. J., Buisman, C. J., & Ter Heijne, A. (2013). Microbial community analysis of a methane-producing biocathode in a bioelectrochemical system. *Archaea*, 2013: 1-12, Article 481784.
- Van Soest, P.J. & Wine, R.H. (1968). Determination of Lignin and cellulose in acid –detergent fiber with permanganate. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 51(4): 780-785.
- Valdez-Vázquez, I., Ríos-Leal, E., esparza-García, F.J., Cecchi, F. & Poggi-Varaldo, H.M. (2005). Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for hydrogen production from organic waste: mesophilic vs. thermophilic regime. *International Journal of Hydrogen Energy*. 30:1383-1391.
- Vogel A.I. (2002). Análise química quantitativa. 6 edición. Rio de Janeiro: LTC, Rio de Janeiro, Brasil.
- Xi, Y. L., Chen, K. Q., Xu, R., Zhang, J. H., Bai, X. F., Jiang, M., Wei P. & Chen, J. Y. (2012). Effect of biotin and a similar compound on succinic acid fermentation by *Actinobacillus succinogenes* in a chemically defined medium. *Biochemical Engineering Journal*, 69: 87-92.
- Xi, Y. L., Dai, W. Y., Xu, R., Zhang, J. H., Chen, K. Q., Jiang, M., Wei, P. & Ouyang, P. K. (2013). Ultrasonic pretreatment and acid hydrolysis of sugarcane bagasse for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(11): 1779-1785.
- Yazdani, S.S. & Gonzalez, R. (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*. 18(3): 213-219.
- Yu, J., Li, Z., Ye, Q., Yang, Y., & Chen, S. (2010). Development of succinic acid production from corncob hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(10): 1033-1040.
- Yu, X., Zheng, Y., Dorgan, K. M., & Chen, S. (2011). Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresource Technology*, 102(10): 6134-6140.
- Zeikus, J. G., Jain, M. K., & Elankovan, P. (1999). Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(5): 545-552.
- Zhang, Y., Li, Q., Zhang, Y., Wang D., Xing, J. (2012) Optimization of succinic acid fermentation with *Actinobacillus succinogenes* by response surface methodology (RSM). *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*. 13(2): 103-110.
- Zhao, Y., Cao, W., Wang, Z., Zhang, B., Chen, K., & Ouyang, P. (2016). Enhanced succinic acid production from corncob hydrolysate by microbial electrolysis cells. *Bioresource Technology*, 202: 152-157.
- Zheng, W., Li, X. M., Yang, Q., Zeng, G. M., Shen, X. X., Zhang, Y., & Liu, J. J. (2007). Adsorption of Cd (II) and Cu (II) from aqueous solution by carbonate hydroxylapatite derived from eggshell waste. *Journal of Hazardous Materials*, 147(1): 534-539.
- Zheng, P., Dong, J. J., Sun, Z. H., Ni, Y., & Fang, L. (2009). Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 100(8): 2425-2429.
- Zheng, P., Fang, L., Xu, Y., Dong, J. J., Ni, Y., & Sun, Z. H. (2010). Succinic acid production from corn stover by simultaneous saccharification and fermentation using *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource Technology*, 101(20): 7889-7894.
- Zulfikar, M.A. Mariske, E.D., Djajanti, S.D. (2012). Adsorption of lignosulfonate compound using powdered eggshells. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 34(3): 309-316.

ANEXOS

Anexo 1. Caracterización de hidrolizado y residuo sólido de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos

1.1. Caracterización del hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos

1.1.1. Determinación de pH

El líquido obtenido se agitó con una varilla de vidrio y se dejó reposar por 10 min en refrigeración a 4 °C. La solución se agitó nuevamente y se registró el pH con ayuda del potenciómetro.

1.1.2. Determinación de azúcares reductores

Se determinó el contenido de azúcares reductores utilizando el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) al hidrolizado resultante de cada tratamiento (Miller, 1959).

Reactivo DNS

1. 1 % de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
2. Solución NaOH al 1% (p/v)
3. Fenol (0.2%; p/v)
4. Sulfito de sodio (Na_2SO_3 ; 0.05%; p/v)
5. Tartrato de sodio y potasio (Sal de Rochelle, también conocida sal Seignette; 40% p/v)

Todos los componentes excepto el tartrato de sodio y potasio fueron disueltos en una solución NaOH al 1% (p/v), se usó un contenedor color ámbar para depositar el reactivo DNS o en su defecto se cubrió el exterior del recipiente con papel aluminio, el sulfito de sodio se adicionó hasta en el momento en el que se usó el reactivo.

25 μL de muestra se colocaron en un tubo de ensayo, el cual se completó a 1 mL con agua destilada. Se le agregaron 3 mL de reactivo DNS, posteriormente se colocó en agua hirviendo durante 15 min, para después colocarle 1 mL de solución de tartrato de sodio y potasio, mientras aún se encontraba caliente.

Se enfriaron los tubos colocándolos en hielo hasta que alcanzaron la temperatura ambiente. Por último, se registró su absorbancia a 575 nm en un espectrofotómetro (Marca Camspec modelo M330). Se realizó una curva de

calibración con una solución de 1 g L^{-1} de dextrosa en el intervalo de 0-1000 μL . Cada determinación se realizó por triplicado.

1.1.3. Determinación de fenoles totales

Reactivos

El cloruro de hierro (III) (0.02M) en 0.1 N de HCl

Hidrocoloide (goma de acacia al 1%)

Ferrocianuro de potasio (0.016 M)

Ácido fosfórico (85%)

Preparación de reactivos

El hidrocoloide fue dispersado en agua destilada hirviendo por 20 a 30 min y se aforó al volumen deseado. Se filtró mientras aún estaba caliente en papel filtro. El filtrado se transfirió a una botella ámbar y se enfrió a temperatura ambiente y se ocupó dentro de las 48 h siguientes.

El cloruro de hierro (III) (0.02M) se preparó disolviendo 1.622 g (2.702 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en 0.1 N HCl. Se filtró en papel filtro y el papel se lavó con agua destilada y se llevó a un volumen final de 500 mL. Las soluciones de 0.02 M de cloruro de hierro y 0.016 M de ferrocianuro de potasio se transfirieron por separado en botellas ámbar y se refrigeraron hasta que fueron ocupadas.

Procedimiento

En tubos de ensayo se colocaron 980 μL de agua destilada y 20 μL de muestra. Posteriormente, se agregó 1 mL de 0.016 M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5.26784 g L^{-1}) seguido inmediatamente de 1 mL de 0.02 M FeCl_3 en 0.1 N HCl. Los contenidos se mezclaron bien y se dejaron a $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Posterior, se agregaron 3 mL de 6.03 M H_3PO_4 (llevar la solución de H_3PO_4 al 28.45% o diluirla 1:2 con agua destilada) y los contenidos se mezclaron bien. Después de dos minutos, se agregó 1 mL de goma de acacia al 1%. Se obtuvo un volumen final de 7 mL. Los contenidos se mezclaron bien y la densidad de color se midió a 700 nm contra un blanco con todos los reactivos excepto fenoles. La curva de calibración (0-1000 μL) se preparó con una solución de 15 mg L^{-1} de ácido gálico.

1.2. Determinación de sólidos restantes del hidrolizado de FORSU

Los residuos sólidos provenientes del tratamiento con H₂SO₄ fueron lavados con agua destilada hasta que el pH de la solución fue 7, se colocaron a 60 °C hasta que alcanzaron su peso constante, el cual se registró.

1.2.1. Determinación de celulosa

La solubilización completa del almidón, proteína, lignina y una gran parte de hemicelulosa se logra con una mezcla de ácido nítrico, ácido acético y ácido tricloroacético, sin embargo, la celulosa permanece intacta. Lo que nos permite someter una muestra de la FORSU a la mezcla de ácidos y mediante una filtración conocer el contenido de celulosa. Se presenta a continuación el procedimiento de acuerdo a Van Soest & Wine (1968):

Método:

1. Se utiliza 1 g de muestra seca (peso C), se añaden 15 mL de ácido acético al 80% y 1.5 ml de HNO₃ concentrado.
2. Se somete a reflujo por 20 min y el residuo se filtra, posteriormente se lava con etanol (concentrado).
3. Se secan las muestras a 100-105 °C por 2 h y se obtiene su peso (peso A)
4. Se incineran a 550 °C por 5 h (peso B).

Finalmente se sustituyen los valores en la Ec. 1.1.

$$\text{Contenido de celulosa (\% base seca)} = \frac{\text{Peso A} - \text{Peso B}}{\text{Peso C}} \times 100 \quad [1.1]$$

1.2.2. Determinación de hemicelulosa

La determinación de hemicelulosa se logra restando el contenido de celulosa de la holocelulosa de la muestra de interés orgánica. La holocelulosa es la suma de hemicelulosas y celulosas. Para determinar el contenido de holocelulosa se remueve la lignina de la muestra mediante una cloración. Se describe el procedimiento a continuación de acuerdo a AOAC (1980):

1. Preparar una solución de alcohol-monoetanolamina disolviendo 3% (v/v) monoetanolamina en alcohol etílico al 95%.
2. Pesar 2 g de muestra desengrasada en un filtro de vidrio poroso grado C, del cual se conoce su peso constante (Peso del filtro de vidrio con la muestra seca). Se clora

la muestra dejándola en reposo por 12 h con una solución de hipoclorito de sodio comercial NaClO (generalmente se encuentra al 10%v) al 50% (v/v).

3. Remover el hipoclorito de sodio filtrando al vacío. Añadir alcohol al 95% para disolver el exceso de NaClO por 1 min y después retirarlo por succión.

4. Lavar con agua destilada fría.

5. Añadir la solución alcohol-monoetanolamina a 75 °C hasta que cubra la muestra completamente. Agitar. Dejar reposar la solución por dos min y eliminar por succión.

6. Se repite el paso anterior.

7. Se elimina cualquier rastro de la solución alcohol-monoetanolamina lavando dos veces con alcohol y después dos veces con agua fría.

8. Colocar en un horno a 103 °C por 12 h y pesar el filtro con la muestra (Peso del filtro con el residuo seco).

Finalmente se sustituyen los valores en la Ec. 1.2.

$$\text{Holocelulosa (\% base seca)} = \frac{P_s - P_v}{P_m} \times 100[\%] \quad [1.2]$$

donde:

P_s : Peso del filtro de vidrio con la muestra seca.

P_v : Peso del filtro con el residuo seco.

P_m : Peso de la muestra seca.

1.2.3. Determinación de lignina

La hidrólisis del contenido celulósico en una muestra orgánica permite la determinación de la lignina, esta hidrólisis se logra mediante la digestión de la muestra con H₂SO₄ e incremento de temperatura. A continuación, se presenta el procedimiento de acuerdo a AOAC (1980):

1. Se pesan 200 a 300 mg de muestra seca, posteriormente la muestra se coloca en un tubo de rosca (Peso de la muestra seca).

2. Se debe añadir 1 mL de H₂SO₄ al 72% frío por cada 100 mg de muestra.

3. La muestra se coloca por 1 h en baño maría a 30 °C agitando constantemente para lograr homogenizar completamente la suspensión (esta debe volverse de color negro).

4. El digerido se diluye con 28 mL de agua destilada por cada mL de ácido y se transfiere el contenido del tubo de rosca a un matraz Erlenmeyer de 125 mL.

5. Se realiza una hidrólisis secundaria en una autoclave, manteniendo a 120 °C por 1 h.
6. Posterior se hace pasar el contenido del matraz Erlenmeyer por un filtro de microfibras de vidrio grado GF/C (1.2 µm) colocado en el fondo de un filtro Gooch, se realizan lavados con agua destilada para la remoción completa del H₂SO₄.
7. Se seca la muestra a 105 °C por 4 h hasta alcanzar el peso constante, el cual se registra (Peso seco de muestra).
8. Se calcina la muestra a 550 °C (verificar que la mufla no este con la temperatura elevada, todas las muestras deben ir tapadas con papel aluminio (dejar enfriar los crisoles por 5 h) y se registra su peso (Peso de la muestra una vez calcinada).

Finalmente se sustituyen los valores en la Ec. 1.3.

$$\text{Lignina (\% base seca)} = \frac{P_s - P_c}{P_m} \times 100[\%] \quad [1.3]$$

donde:

P_s: Peso seco de muestra

P_c: Peso de la muestra una vez calcinada

P_m: Peso de la muestra seca.

Anexo 2. Otros ensayos de deslignificación e hidrólisis de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos

2.1. Tratamiento alcalino con NaOH

Se aplicó NaOH al 0.5, 1, 2 y 4%, ninguno de los tratamientos mejoró la cantidad de azúcares liberados en relación al grupo control 0% de NaOH. El NaOH no es una alternativa al uso de ácido sulfúrico. El principal efecto del hidróxido de sodio en residuos lignocelulósicos es la deslignificación, al romper los enlaces ester entre la lignina y xilana, y así incrementar la porosidad de la biomasa (Tarkow & Feist, 1969).

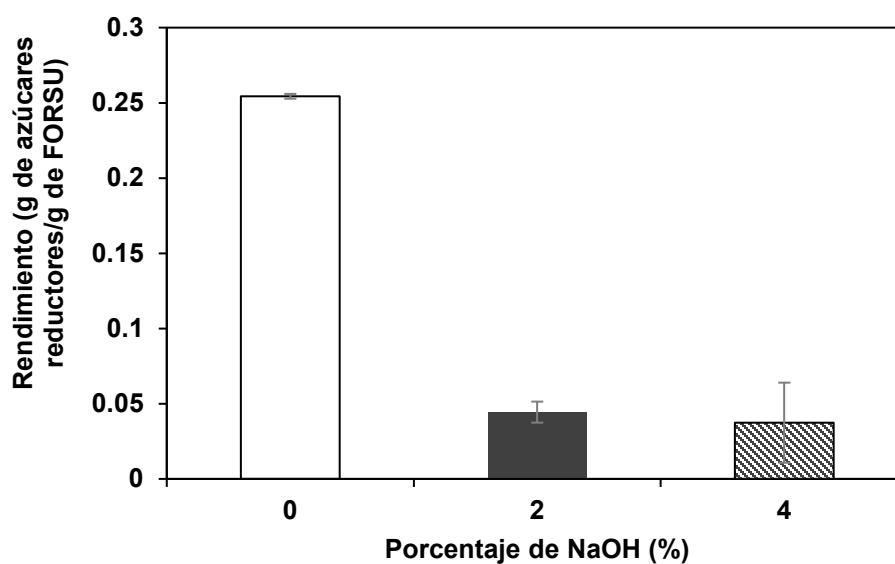


Figura 2.1. Efecto del tratamiento alcalino con NaOH en la obtención de azúcares reductores de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos

Tabla 2.1. Azúcares reductores liberados durante la hidrólisis ácida a 121 °C y 15 psi a diferentes tiempos y concentraciones de H₂SO₄

H ₂ SO ₄ (%)	Tiempo			
	8 (min)	10 (min)	15 (min)	20 (min)
0	-	8.8±1.1	9.8±0.7	10.0±0.5
0.6	-	-	13.3±2.5	-
1	-	14.4±0.7	-	15.5±1.1
2	18.4±2.1	-	20.3±0.5	-
3	-	22.6±0.46	-	25.4±2.6
3.4	-	-	24.6±3.2	-

Notas: Las concentraciones están dadas en g L⁻¹ ± desviación estándar. Los espacios con guion significan que no se realizaron esos ensayos.

Anexo 3. Determinación de cloro libre

3.1 Reactivos

Tiosulfato de sodio (PM 158.11 g mol⁻¹; Na₂S₂O₃) Pentahidratado (PM 248.18 g/mol; Na₂S₂O₃ 5H₂O)

Pesar 24.8 g para 1 L de reactivo.

500 mL pesar 12.409 g de tiosulfato pentahidratado y diluir en agua

Yodato de potasio (KIO₃) (PM 214.001 g mol⁻¹) 0.02 M

Pesar 4.28 g para 1 L de reactivo

100 mL, pesar 0.428 g de KIO₃ y diluirlo en 100 mL

Yoduro de potasio (KI) (PM 166.0028) al 10% (p/v).

60 mL de solución, a 6 g de KI agregar 54 mL de agua destilada

Ácido sulfúrico (3 mL por muestra)

Ácido acético glacial (3 mL por muestra)

Solución de almidón (3% p/v)

Disolver en agua en ebullición, Se preparó en el momento de ser utilizada.

3.2. Estandarización de la solución de tiosulfato de sodio al 0.1 M

En un frasco Erlenmeyer, se agregaron 25 mL de Yodato de potasio (KIO₃) 0.02 mol L⁻¹ a 10 mL de yoduro de potasio al 10% (p/v). Posteriormente, se agregaron 3 mL de H₂SO₄ (momento en el cual la muestra se torna en un color café). La mezcla se tituló con la solución problema de tiosulfato de sodio hasta alcanzar un color amarillo pálido. Posterior se agregaron 3 mL de la solución de almidón al 3%, que resulto en un color azul intenso, se continuó la titulación hasta alcanzar una mezcla incolora (Machado *et al.*, 2014 based in Vogel, 2002).



$$6 M_{\text{yodato}} \times V_{\text{yodato}} = M_{\text{tiosulfato}} \times V_{\text{tiosulfato}} \quad (3.2)$$

donde M_{yodato} representa la molaridad del yodato de potasio, corresponde a 0.02329 mol. V_{yodato} significa el volumen del yodato de potasio agregado a la mezcla, que son 25 mL. $M_{\text{tiosulfato}}$ representa la concentración de tiosulfato, que es determinada en mol L⁻¹; $V_{\text{tiosulfato}}$ significa el volumen utilizado en la concentración.

3.3. Procedimiento para determinar el porcentaje de cloro

Agregar en un matraz Erlenmeyer 5 mL de muestra, 25 mL de agua destilada, 2 mL de solución al 10% de yoduro de potasio y 3 mL de ácido acético glacial, esta mezcla se tituló con la solución estandarizada de tiosulfato de sodio hasta obtener un color amarillo pálido. Posterior se agregaron 3 mL de 3% de solución de almidón (p/v), la mezcla mostró un intenso color azul y se continuó con la titulación hasta que la mezcla quedo incolora. Se registró el volumen utilizado.

$$1000\left(\frac{2(m_{\text{hipoclorito}})}{MM_{\text{hipoclorito}}}\right) = M_{\text{tiosulfato}} \times V_{\text{tiosulfato}} \quad (3.3)$$

donde $M_{\text{hipoclorito}}$ representa la masa del hipoclorito de sodio en la alícuota (g). $MM_{\text{hipoclorito}}$ significa la masa molar del hipoclorito de sodio, que corresponde a 74.5 g. $M_{\text{tiosulfato}}$ representa la molaridad de la solución tiosulfato de sodio estandarizada. $V_{\text{tiosulfato}}$ significa el volumen de la solución de tiosulfato de sodio utilizada para titular cada muestra.

Después de encontrar la masa de hipoclorito de sodio en la muestra (la cual corresponde a un volumen de 5 mL), se utilizó una regla de tres para determinar la concentración de hipoclorito de sodio en 100 mL (%).

Anexo 4. Secuencia de la subunidad 16s de *Caprina EHC*

GAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTT
GCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTAC
TGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTT
GCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGA
TCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTA
TGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCT
TTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTTGTTAAG
TCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTC
GTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGT
GGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
ATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCG
TGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAATC
AAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAA
GAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACC
GTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAAGTCAAAGGAGACTGCCAG
TGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACA
CACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAG
TGCGTAGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG
TGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGG
GAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTC
ATGACTGGGG

Anexo 5. Cromatogramas de los compuestos analizados

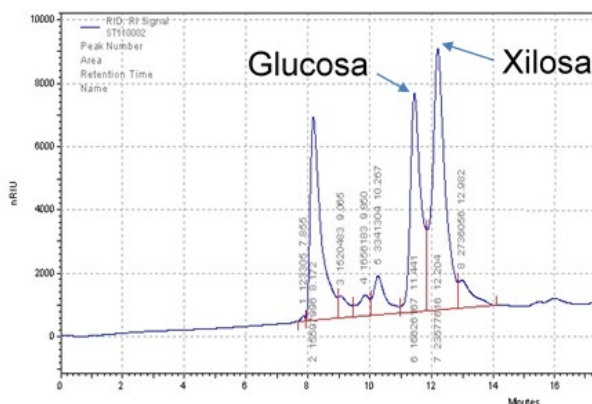


Figura 5.1. Cromatograma correspondiente a los azúcares glucosa y xilosa en hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos. Tiempo de retención glucosa 11.441 y xilosa 12.197. Determinado mediante HPLC-RID.

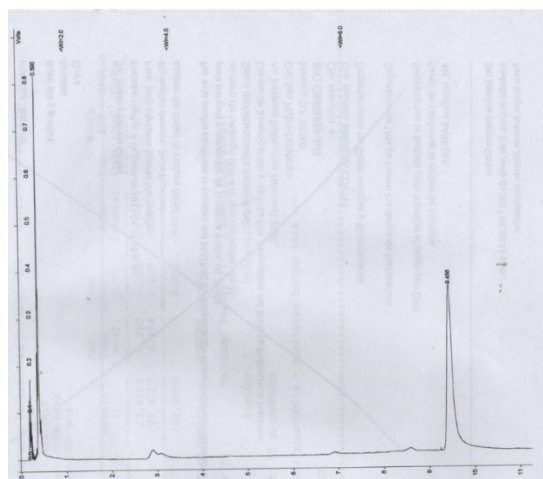


Figura 5.2. Cromatograma correspondiente a 5-(hidroximetil)furfural. Tiempo de retención 9.456 min. Determinado mediante CG-FID.

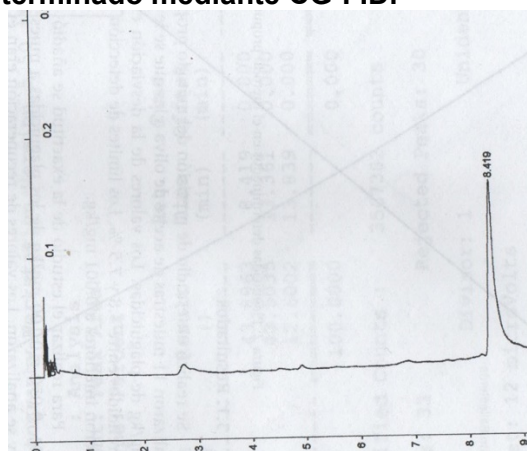


Figura 5.3. Cromatograma correspondiente a ácido levulínico. Tiempo de retención 8.419 min. Determinado mediante CG-FID.

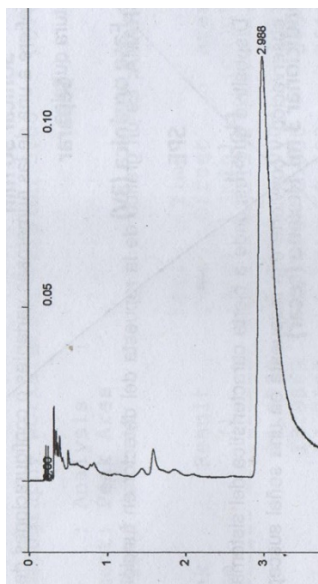


Figura 5.4. Cromatograma correspondiente a ácido fórmico. Tiempo de retención 2.988 min. Determinado mediante HPLC-RID.

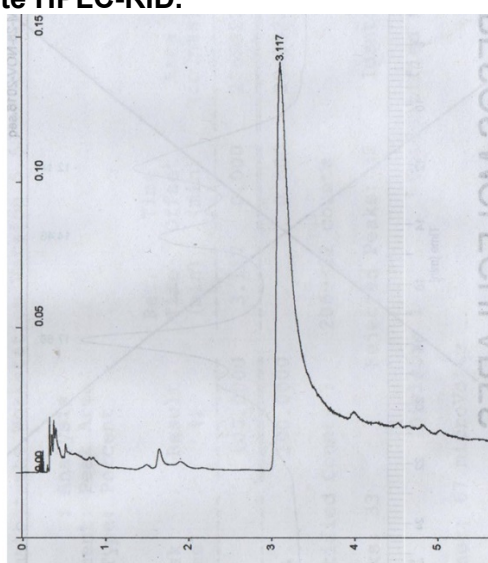


Figura 5.5. Cromatograma correspondiente a ácido acético. Tiempo de retención 3.11 min. Determinado mediante HPLC-RID.

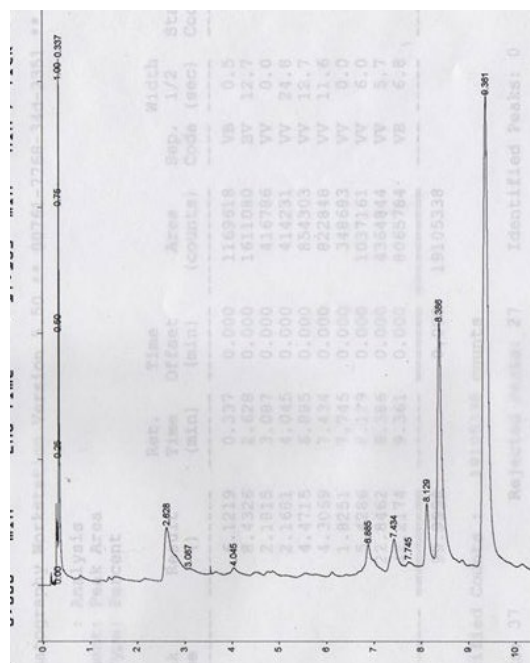


Figura 5.6. Cromatograma correspondiente de compuestos Inhibidores en hidrolizado de FORSU no detoxificado.

Anexo 6. Tablas de Análisis de Varianza del experimento de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos.

Tabla 6.1. Análisis de varianza de factorial 2² H₂SO₄ (%) y Tiempo (min) con cinco puntos centrales como variable de respuesta azúcares reductores

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	p-value
Model	259.55	3	86.52	19.47	< 0.0001 significant
A-H2SO4	246.22	1	246.22	55.41	< 0.0001
B-Tiempo	11.38	1	11.38	2.56	0.1355
AB	1.94	1	1.94	0.4364	0.5213
Curvature	1.94	1	1.94	0.4370	0.5211
Pure Error	53.33	12	4.44		
Cor Total	314.82	16			

Factor coding is Coded.

Sum of squares is **Type III - Partial**

The **Model F-value** of 19.47 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that an F-value this large could occur due to noise.

P-values less than 0.0500 indicate model terms are significant. In this case A is a significant model term. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

Tabla 6.2. Análisis de varianza los fenoles remanentes en hidrolizado de FORSU por CHP, pH y tiempo de contacto

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	p-value
Model	17594.74	103	170.82	5.52	< 0.0001 significant
A-pH	1349.40	3	449.80	14.54	< 0.0001
B-Tiempo	6539.37	12	544.95	17.61	< 0.0001
C-CHP	3914.97	1	3914.97	126.52	< 0.0001
AB	2746.71	36	76.30	2.47	< 0.0001
AC	798.58	3	266.19	8.60	< 0.0001
BC	683.29	12	56.94	1.84	0.0437
ABC	1562.43	36	43.40	1.40	0.0757
Pure Error	6436.03	208	30.94		

Cor Total 24030.77 311

Factor coding is **Coded.**

Sum of squares is **Type II Classical**

The **Model F-value** of 5.52 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that an F-value this large could occur due to noise.

P-values less than 0.0500 indicate model terms are significant. In this case A, B, C, AB, AC, BC are significant model terms. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

Tabla 6.3. Análisis de varianza cinética de remoción de azúcares reductores en hidrolizado de FORSU por CHP, pH y tiempo de contacto

Response 2: Azúcares reductores

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	p-value
Model	1346.38	103	13.07	6.21	< 0.0001 significant
A-pH	878.12	3	292.71	139.07	< 0.0001
B-Tiempo	88.88	12	7.41	3.52	< 0.0001
C-CHP	10.92	1	10.92	5.19	0.0238
AB	243.04	36	6.75	3.21	< 0.0001
AC	14.27	3	4.76	2.26	0.0826
BC	25.51	12	2.13	1.01	0.4408
ABC	85.65	36	2.38	1.13	0.2927
Pure Error	437.77	208	2.10		
Cor Total	1784.15	311			

Factor coding is **Coded.**

Sum of squares is **Type II Classical**

The **Model F-value** of 6.21 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that an F-value this large could occur due to noise.

P-values less than 0.0500 indicate model terms are significant. In this case A, B, C, AB are significant model terms. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

Tabla 6.4. Análisis de varianza de tamaño de partícula del cascarón de huevo en polvo

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Antes	163	7162.015	43.94	1612.73
Después	68	5179.182	76.16	978.49

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>GL</i>	<i>MSS</i>	<i>Fexp</i>	<i>P (Fexp)</i>	<i>Fc</i>
Tipo de tratamiento	49829.81	1	49829.81	34.92	1.24E-08	3.88
Error	326821.46	229	1427.17			
Total	376651.27	230				

Anexo 7. ANOVA sección electrofermentación

7.1. Análisis de Varianza de la masa de succínico producida en los cuatro tratamientos experimentales T1, T2, T3 y T4.

Tabla 7.1. Análisis de Varianza de la masa de succínico producida en las cuatro electrofermentaciones T1, T2, T3 y T4.

RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	<i>s</i>	
T1	2	25.608	12.804	0.499	0.706	
T2	2	28.962	14.481	0.638	0.799	
T3	2	9.756	4.878	0.072	0.269	
T4	2	12.8	6.400	0.125	0.353	

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>GL</i>	<i>MSS</i>	<i>Fexp</i>	<i>P (Fexp)</i>	<i>Fc</i>
Tipo de tratamiento	133.24	3	44.41	133.21	0.00018	6.59
Error	1.33	4	0.33			
Total	134.57	7				

7.2. Análisis de Varianza de la eficiencia $\eta_{EF/fc}$ producida en los cuatro tratamientos experimentales T1, T2, T3 y T4.

Tabla 7.2. Análisis de Varianza de la eficiencia $\eta_{EF/fc}$ producida en las cuatro electrofermentaciones T1, T2, T3 y T4.

RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	<i>EDE</i>	
T1	2	2.0000	1.0	0.0072	0.08485281	
T2	2	2.9000	1.5	0.0151	0.12303658	
T3	2	4.4000	2.2	0.0348	0.18667619	
T4	2	2.0200	1.0	0.0073	0.08570134	

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>GL</i>	<i>MSS</i>	<i>Fexp</i>	<i>P (Fexp)</i>	<i>Fc</i>
Tipo de tratamiento	1.9074	3	0.636	39.41	0.00199	6.59
Error	0.0645	4	0.016			
Total	1.9719	7				

7.3. Análisis de Varianza de índice ω de los cuatro tratamientos experimentales T1, T2, T3 y T4.

Tabla 7.3. Análisis de Varianza de índice ω de las cuatro electrofermentaciones T1, T2, T3 y T4.

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	<i>s</i>
T1	2	0.74484	0.3724	4.22E-04	0.02054
T2	2	0.78355	0.3918	4.67E-04	0.02161
T3	2	0.19224	0.0961	2.81E-05	0.00530
T4	2	0.55628	0.2781	2.35E-04	0.01534

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>GL</i>	<i>MSS</i>	<i>Fexp</i>	<i>P (Fexp)</i>	<i>Fc</i>
Tipo de tratamiento	0.10953	3	3.65E-02	126.74	2.03E-04	6.59
Error	0.00115	4	2.88E-04			
Total	0.11068	7				

7.4. Análisis de Varianza de rendimiento de producción de ácido succínico de los cuatro tratamientos experimentales T1, T2, T3 y T4.

Tabla 7.4. Análisis de Varianza de rendimiento de producción de ácido succínico de las cuatro electrofermentaciones T1, T2, T3 y T4.

RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	<i>s</i>	
T1	2	1.586	0.793	0.0141	0.11893204	
T2	2	1.59	0.795	0.0142	0.11923199	
T3	2	0.532	0.266	0.0016	0.03989397	
T4	2	0.364	0.182	0.0007	0.02729588	

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>GL</i>	<i>MSS</i>	<i>Fexp</i>	<i>P (Fexp)</i>	<i>Fc</i>
Tipo de tratamiento	0.65686	3	2.19E-01	28.53	3.68E-03	6.59
Error	0.03070	4	7.67E-03			
Total	0.68756	7				

7.5. Análisis de Varianza de índice ψ de producción de ácido succínico de los cuatro tratamientos experimentales T1, T2, T3 y T4.

Tabla 7.5. Análisis de Varianza de índice ψ de producción de ácido succínico de las cuatro electrofermentaciones T1, T2, T3 y T4.

RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	<i>S</i>	
T1	2	1.48E-04	7.39E-05	8.73E-12	2.95E-06	
T2	2	2.07E-02	1.03E-02	1.71E-07	4.14E-04	
T3	2	5.63E-05	2.81E-05	1.27E-12	1.13E-06	
T4	2	7.39E-05	3.69E-05	2.18E-12	1.48E-06	

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Source</i>	<i>SS</i>	<i>GL</i>	<i>MSS</i>	<i>Fexp</i>	<i>P (Fexp)</i>	<i>Fc</i>
Entre grupos	0.00015905	3	5.3017E-05	1239.134	2.1655E-06	6.59138212
Dentro de los grupos	1.7114E-07	4	4.2786E-08			
Total	0.00015922	7				

Anexo 8. Cálculo de energía consumida por la celda de electrosíntesis microbiana

La ecuación utilizada en el cálculo de la energía eléctrica durante el tiempo de operación de la CESIM fue

$$E_{electr} = \int_0^t E' \times i \times \Delta t \quad (8.1)$$

donde E' significa el voltaje suministrado a la CESIM en un t_j , i representa la intensidad registrada por la CESIM en un t_j , y Δt representa la diferencia en tiempo.

La Fig. 8.1 muestra el montaje de la celda de electrofermentación y equipo auxiliar.

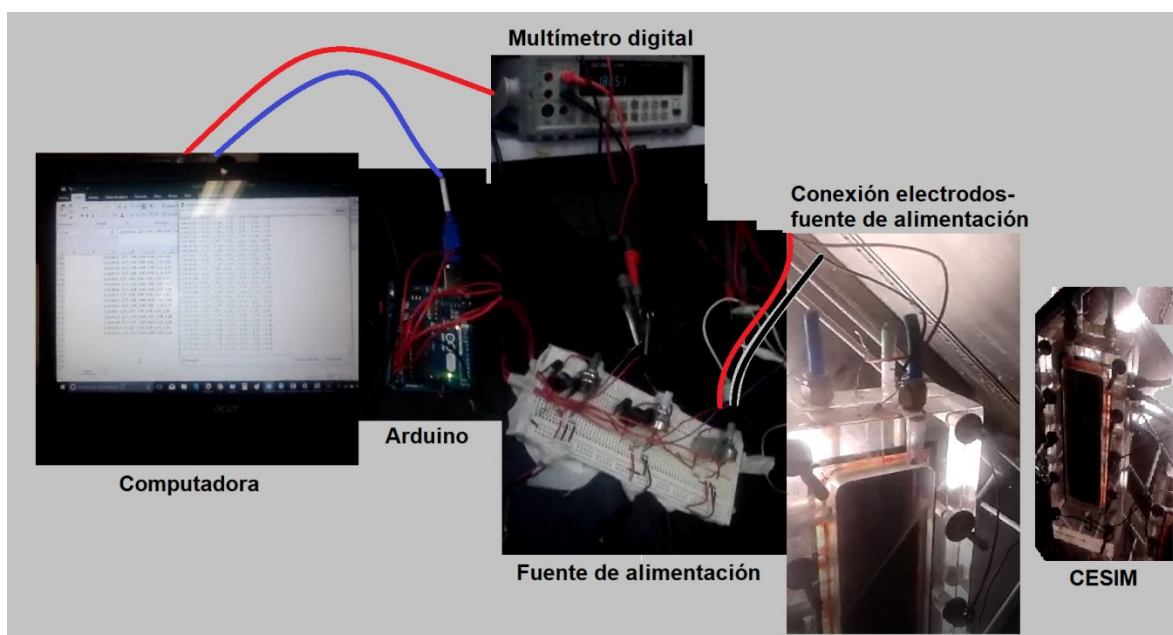


Figura 8.1. Montaje de la celda de electrofermentación microbiana para la producción de ácido succínico mediante celda de electrosíntesis microbiana (CESIM).

Las dinámicas de voltaje, intensidad y potencia de las cuatro electrofermentaciones de este trabajo se exhiben en las figuras 8.2 a 8.5. La potencia a través del tiempo fue integrada numéricamente para obtener la energía eléctrica consumida en el intervalo de operación. La integración se hizo por el método de integración trapecoidal.

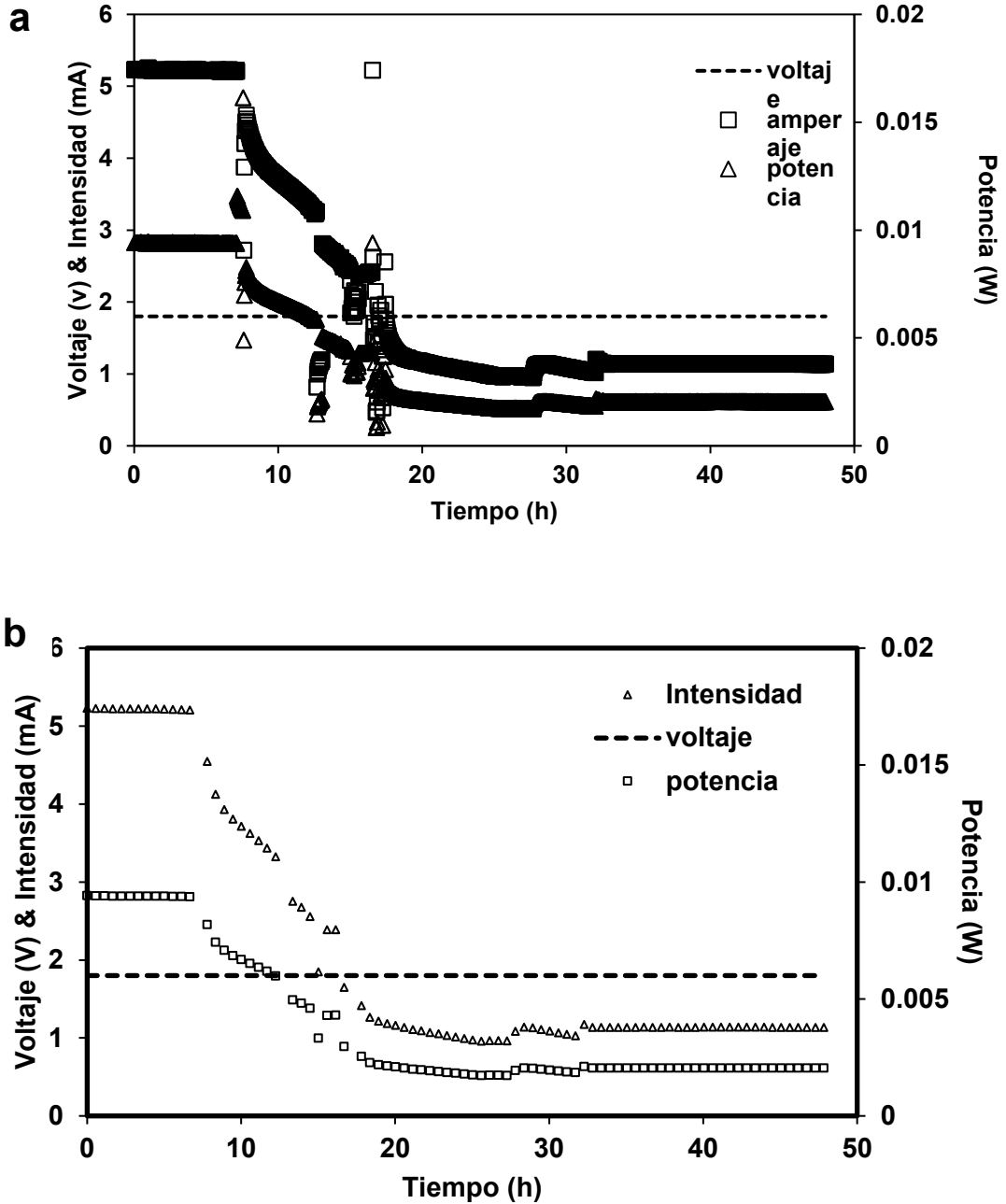


Figura 8.2. Consumo de corriente en producción de ácido succínico por *A. succinogenes* (T1) a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos mediante una celda de electrosíntesis microbiana utilizando una membrana de Nafion como separador y $MgCO_3$ como neutralizador de pH. (a) todos los puntos; (b) 1 de cada 30 puntos para mejorar la visibilidad.

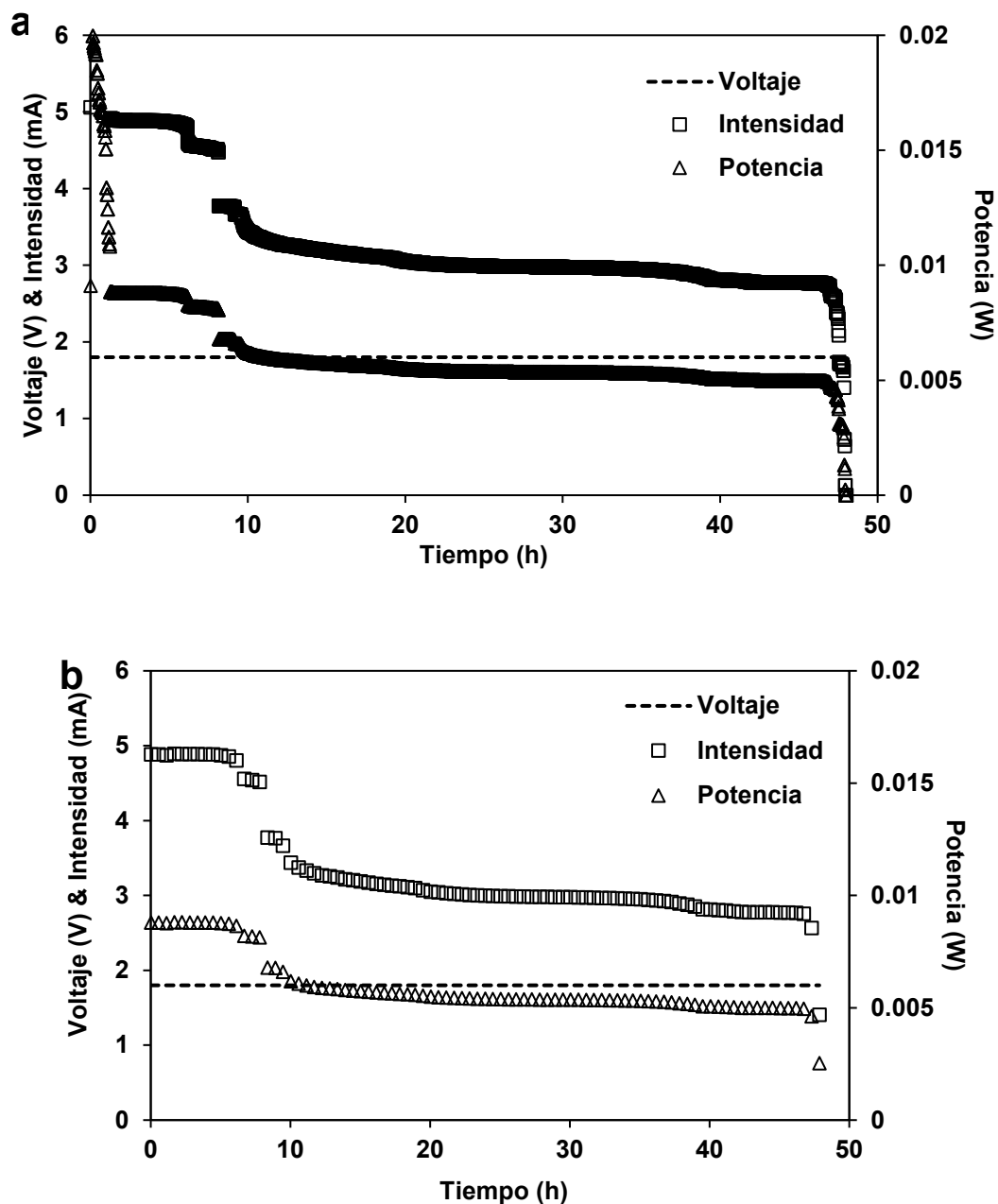


Figura 8.3. Consumo de corriente en producción de ácido succínico por *A. succinogenes* (T2) a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos mediante una celda de electrosíntesis microbiana utilizando una membrana de agar como separador y MgCO_3 como neutralizador de pH. (a) todos los puntos; (b) 1 de cada 30 puntos para mejorar la visibilidad.

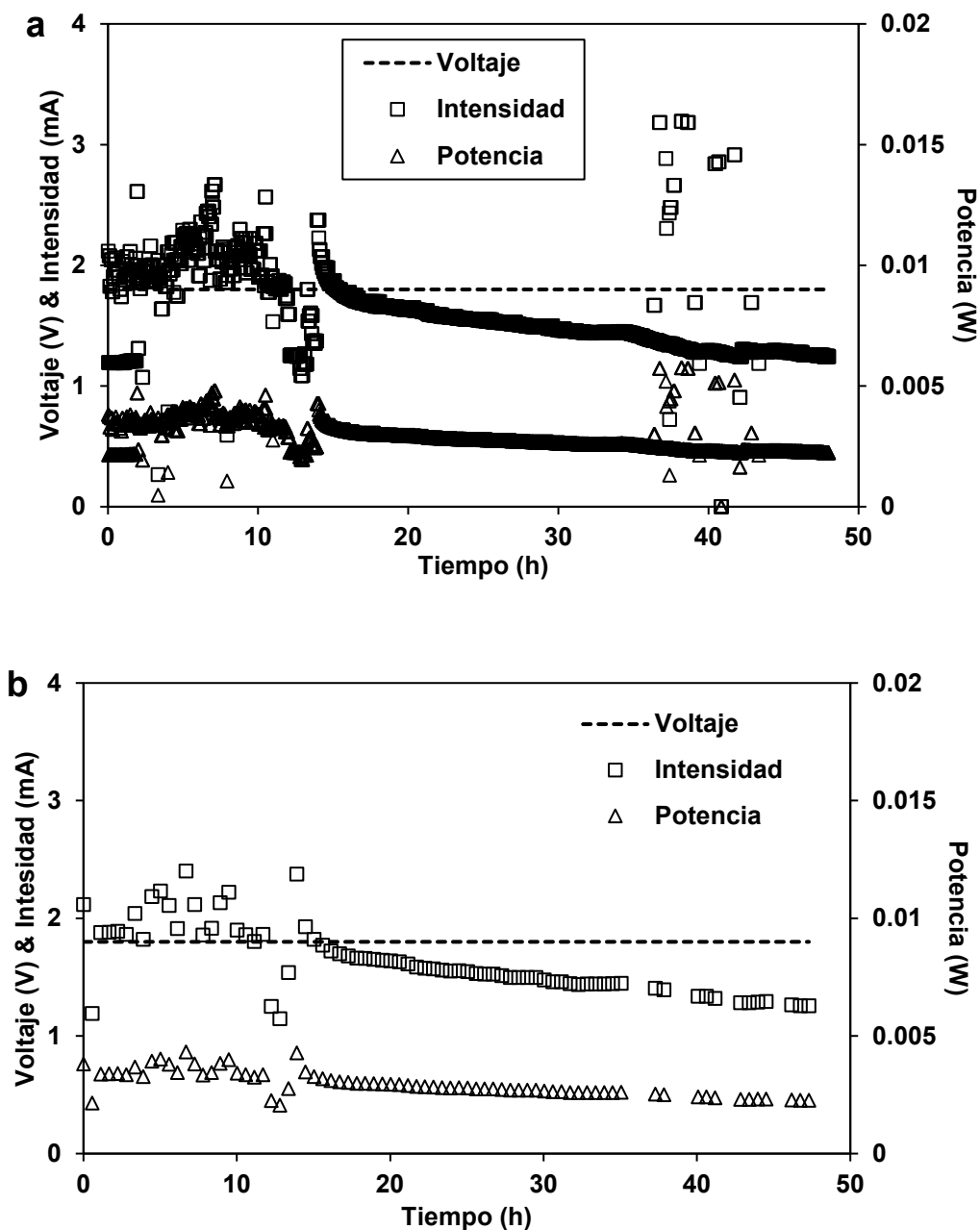


Figura 8.4. Consumo de corriente en producción de ácido succínico por *Caprina EHC* (T3) a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos mediante una celda de electrosíntesis microbiana utilizando una membrana de Nafion y MgCO_3 como neutralizador de pH. (a) todos los puntos; (b) 1 de cada 30 puntos para mejorar la visibilidad.

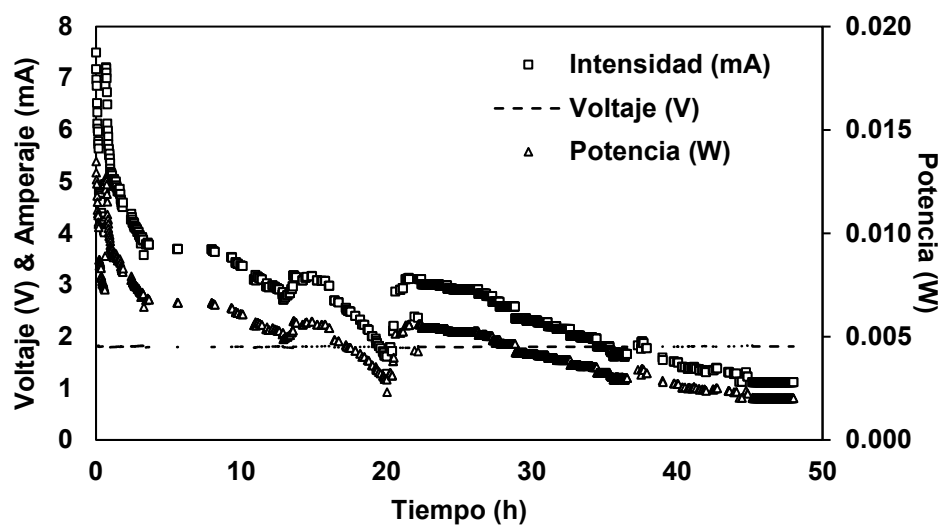


Figura 8.5. Consumo de corriente en producción de ácido succínico por *A. succinogenes* (T4) a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos mediante una celda de electrosíntesis microbiana utilizando una membrana de Nafion y NaHCO_3 como neutralizador de pH.

Anexo 9. Código para programación en Arduino para el monitoreo de voltaje en las electrofermentaciones mediante celdas de electrosíntesis microbianas

```
#include <TimeLib.h>
const int NUM_LEC = 10;
const int NUM_PRINT = 180;
```

```
float voltage0 = 0;
float voltage1 = 0;
float voltage2 = 0;
float voltage3 = 0;
float voltage4 = 0;
float voltage5 = 0;
float voltagePrint0 = 0;
float voltagePrint1 = 0;
float voltagePrint2 = 0;
float voltagePrint3 = 0;
float voltagePrint4 = 0;
float voltagePrint5 = 0;
float voltageAV0 = 0;
float voltageAV1 = 0;
float voltageAV2 = 0;
float voltageAV3 = 0;
float voltageAV4 = 0;
float voltageAV5 = 0;
float voltage01 = 0;
float voltage11 = 0;
float voltage21 = 0;
float voltage31 = 0;
float voltage41 = 0;
float voltage51 = 0;
```

```
float TOTAL_LEC = 0;
float TOTAL_LEC1 = 0;
float TOTAL_LEC2 = 0;
float TOTAL_LEC3 = 0;
float TOTAL_LEC4 = 0;
float TOTAL_LEC5 = 0;
int Lec = 0;
int Lec1 = 0;
int Lec2 = 0;
int Lec3 = 0;
int Lec4 = 0;
int Lec5 = 0;
```

```
float totalLecturas = 0;
float totalLecturas1 = 0;
float totalLecturas2 = 0;
float totalLecturas3 = 0;
float totalLecturas4 = 0;
float totalLecturas5 = 0;
```

```

float promedioLecturas = 0;
float promedioLecturas1 = 0;
float promedioLecturas2 = 0;
float promedioLecturas3 = 0;
float promedioLecturas4 = 0;
float promedioLecturas5 = 0;

int i;
int j = 0;
int Index = 0;
int Index2 = 0;
//
//int inputPin0 = A0;
//int inputPin1 = A1;
//int inputPin2 = A2;
//int inputPin3 = A3;
//int inputPin4 = A4;
//int inputPin5 = A5;

void setup() {
  Serial.begin(9600);
  analogReference(DEFAULT); //INTERNAL;
  Serial.println("CLEARDATA");
  Serial.println("LABEL,TIME, CELDA 1 A(V), CELDA 1 B(V), CELDA 2 A(V), CELDA 2 B(V),
  CELDA 3 A(V), CELDA 3 B(V)");

}

void loop() {

  while (j < NUM_PRINT){

    //las iteraciones se programan para una lectura cada 100 ms y un promedio cada 2 s
    for (int i = 0; i < NUM_LEC; i++){

      Lec = analogRead(A0);
      float voltageLEC0 = Lec * (5 / 1023.000);
      totalLecturas = totalLecturas + voltageLEC0;
      Lec1 = analogRead(A1);
      float voltageLEC1 = Lec1 * (5 / 1023.000);
      totalLecturas1 = totalLecturas1 + voltageLEC1;
      Lec2 = analogRead(A2);
      float voltageLEC2 = Lec2 * (5 / 1023.000);
      totalLecturas2 = totalLecturas2 + voltageLEC2;
      Lec3 = analogRead(A3);
      float voltageLEC3 = Lec3 * (5 / 1023.000);
      totalLecturas3 = totalLecturas3 + voltageLEC3;
      Lec4 = analogRead(A4);
      float voltageLEC4 = Lec4 * (5 / 1023.000);
      totalLecturas4 = totalLecturas4 + voltageLEC4;
      Lec5 = analogRead(A5);
    }
  }
}

```

```

float voltageLEC5 = Lec5 * (5 / 1023.000);
totalLecturas5 = totalLecturas5 + voltageLEC5;

delay(10);

}
TOTAL_LEC = totalLecturas;
TOTAL_LEC1 = totalLecturas1;
TOTAL_LEC2 = totalLecturas2;
TOTAL_LEC3 = totalLecturas3;
TOTAL_LEC4 = totalLecturas4;
TOTAL_LEC5 = totalLecturas5;
totalLecturas = 0;
totalLecturas1 = 0;
totalLecturas2 = 0;
totalLecturas3 = 0;
totalLecturas4 = 0;
totalLecturas5 = 0;
i = 0;
j++;
}

```

```

voltageAV0 = TOTAL_LEC / NUM_LEC;
voltageAV1 = TOTAL_LEC1 / NUM_LEC;
voltageAV2 = TOTAL_LEC2 / NUM_LEC;
voltageAV3 = TOTAL_LEC3 / NUM_LEC;
voltageAV4 = TOTAL_LEC4 / NUM_LEC;
voltageAV5 = TOTAL_LEC5 / NUM_LEC;

// if (voltageAV0 <= 0.100){
//   voltagePrint0 = (voltageAV0 + 0.0018)*(1000);}
// else if (voltageAV0 >= 0.100){
//   voltagePrint0 = (voltageAV0 + 0.0018)*(1000);}
// else {
//   voltagePrint0 = voltageAV0;///  

// }

// if (voltageAV1 <= 0.100){
//   voltagePrint1 = (voltageAV1 + 0.00245)*(1000);}
// else if (voltageAV1 >= 0.100){
//   voltagePrint1 = (voltageAV1 + 0.0018)*(1000);}
// else {
//   voltagePrint1 = voltageAV1;///  

// }

// if (voltageAV2 <= 0.100){
//   voltagePrint2 = (voltageAV2 + 0.00245)*(1000);}
// else if (voltageAV2 > 0.100){
//   voltagePrint2 = (voltageAV2 + 0.0018)*(1000);}
// else{
//   voltagePrint2 = voltageAV2;///  

// }

```

```

// if (voltageAV3 <= 0.100){
//   voltagePrint3 = (voltageAV3 + 0.00245)*(1000);}
// else if (voltageAV3 > 0.100){
//   voltagePrint3 = (voltageAV3 + 0.0018)*(1000);}
// else{
//   voltagePrint3 = voltageAV3;//}

// if (voltageAV4 <= 0.100){
//   voltagePrint4 = (voltageAV4 + 0.00245)*(1000);}
// else if (voltageAV4 > 0.100){
//   voltagePrint4 = (voltageAV4 + 0.0018)*(1000);}
// else{
//   voltagePrint4 = voltageAV4;//}

// if (voltageAV5 <= 0.100){
//   voltagePrint5 = (voltageAV5 + 0.00245)*(1000);}
// else if (voltageAV5 > 0.100){
//   voltagePrint5 = (voltageAV5 + 0.0018)*(1000);}
// else{
//   voltagePrint5 = voltageAV5;//}

// time_t t = now(); // Store the current time in time variable t
// hour(t); // Returns the hour
// minute(t); // Returns the minute
// second(t); // Returns the second for the given
// day(t); // The day for the given time t

//   Serial.print("DATA,TIME ");
//   Serial.print("celdA1");
Serial.print(day());
Serial.print(":");
Serial.print(hour());
Serial.print(":");
Serial.print(minute());
Serial.print(":");
Serial.print(second());
Serial.print(" - ");
Serial.print(voltagePrint0);
Serial.print(" , ");
Serial.print(voltagePrint1);
Serial.print(" , ");
Serial.print(voltagePrint2);
Serial.print(" , ");
Serial.print(voltagePrint3);
Serial.print(" , ");
Serial.print(voltagePrint4);
Serial.print(" , ");
Serial.println(voltagePrint5);
//Serial.println(" ROW,SET,2");

```

```
TOTAL_LEC = 0;  
TOTAL_LEC1 = 0;  
TOTAL_LEC2 = 0;  
TOTAL_LEC3 = 0;  
TOTAL_LEC4 = 0;  
TOTAL_LEC5 = 0;  
voltageAV0 = 0;  
voltageAV1 = 0;  
voltageAV2 = 0;  
voltageAV3 = 0;  
voltageAV4 = 0;  
voltageAV5 = 0;
```

```
voltagePrint0= 0;  
voltagePrint1= 0;  
voltagePrint2= 0;  
voltagePrint3= 0;  
voltagePrint4= 0;  
voltagePrint5= 0;
```

```
j = 0;
```

```
}
```