



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y
BIOINGENIERÍA

**“Efecto del número de cámaras sobre el desempeño de
una *CESIM* productora de ácido succínico”**

TESIS

Que presenta

SARA ABAUNZA ALVARADO

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de Tesis: **Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo**

Ciudad de México

FEBRERO, 2020

El Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) apoyó a la Biol. Sara Abaunza Alvarado con la beca de posgrado número 632857.

Comité tutorial

Dr. Héctor M. Poggi Varaldo (1) (Director)

Dr. Omar Solorza Feria (2) (Asesor)

Dra. Tatiana Romero Castañón (3) (Asesor)

Dr. Graciano Calva Calva (4) (Asesor)

Dra. Josefina Barrera Cortés (5) (Asesor)

(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 Química.

(3) Gerencia de Energías Renovables del Instituto Nacional de Electricidad y Energías Limpias.

(4) CINVESTAV del IPN, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

(5) CINVESTAV del IPN, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

AGRADECIMIENTOS

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

A la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares, al Biól. Juan Carlos Estrada Mora y Dr. Daniel A. Estrada Bárcenas por la entrega de la cepa utilizada en este proyecto *A. succinogenes* 130Z, asesorías para su manejo y facilitación de la observación de la misma por microscopía óptica.

A la Dra. Teresa Ponce Noyola, Investigadora titular por su apoyo en la facilitación del uso de HPLC de su laboratorio, asesorías e interés en el proyecto.

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

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 H₂Succ y productos concomitantes, por su enseñanza en el uso del HPLC y por compartir su experiencia en la investigación.

Al 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 la Cand. Dra. Miriam Téllez Cruz del Departamento de Química por su ayuda en los análisis de XRD, RAMAN, y su invaluable apoyo en el desarrollo de modificaciones del electrodo de este trabajo.

A Sebastián Citalán Cigarroa del Departamento de Química por su ayuda en el diseño y realización de modificaciones al diseño de la celda y a Andrés Rodríguez Castellanos por su asistencia durante la parte del trabajo elaborada en el Departamento de Química.

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

DEDICATORIAS

A mi mamá, María de la Luz Alvarado Gil, por todo su apoyo incondicional durante esta etapa de mi vida y toda mi vida.

A César Pacheco, por tu apoyo en esta travesía y compartir esta vida juntos. Por tu ayuda en todos sentidos

A mi familia, gracias por todo.

A mis amigos Biólogos que siguen apoyándome y mantenemos la amistad.

A mis amigos del laboratorio 33 y 34, Catherine, Giovanni Amaury, Alejandra, Orlando, Alfredo por acompañarme en este viaje de posgrado y hacer más llevadero este camino

I. ÍNDICE

Agradecimientos	iv
Dedicatorias	v
I. Índice	vi
II. Índice de tablas	ix
III. Índice de figuras	x
IV. Notación	xiii
V. Resumen	xv
VI. Abstract	xvi
1. Introducción y antecedentes	17
1.1. Ácido succínico	17
1.2. Síntesis química	18
1.3. Producción por vía fermentativa y empresas	18
1.4. Microorganismos que producen ácido succínico	19
1.5. Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU)	21
1.6. Sistemas bioelectroquímicos	21
1.7. Celdas de electrosíntesis microbiana	22
1.8. Mediador uso y características	23
1.9. Separación del ácido succínico del medio de fermentación	24
1.10. Nanotecnologización de cátodos en <i>CESIM</i>	25
2. Justificación	27
3. Hipótesis	28
4. Objetivo	29
4.1. Objetivo general	29
4.2. Objetivos particulares	29
5. metodología	30
5.1. Plan de trabajo	30
6. Actividades	30
6.1. Actividad 1. Diseño y construcción de <i>CESIM</i>	30
6.1.1. Propósito	30
6.1.2. Técnicas y procedimientos	31
Elaboración de electrodos de referencia de Ag/AgCl	31
6.2. Actividad 2. Preservación, propagación de cepa, e inóculos	32

6.2.1.	Propósito	32
6.2.2.	Diseño experimental.....	32
6.2.3.	Programa de supervisión y análisis	33
6.2.4.	Técnicas y procedimientos	33
6.3.	Actividad 3. Ensayos preliminares de <i>CESIM</i> de 3 cámaras	34
6.3.1.	Propósito	34
6.3.2.	Diseño experimental.....	34
6.3.3.	Programa de supervisión y análisis	35
6.4.	Actividad 4.	37
6.4.1.	Propósito	37
6.4.2.	Diseño experimental.....	37
6.4.3.	Programa de supervisión y análisis	37
6.4.4.	Técnicas y procedimientos	37
6.5.	Actividad 5.	38
6.5.1.	Propósito	38
6.5.2.	Diseño experimental.....	39
6.5.3.	Programa de supervisión y análisis	40
6.5.4.	Técnicas y procedimientos	40
7.	Resultados y discusión.....	42
7.1.	Procuración de materiales y construcción de equipo	42
7.2.	Preservación, propagación de cepa e inóculos	44
7.3.	Ensayos de <i>CESIM</i> de 3 cámaras	45
7.4.	Implementar nanotecnología en el cátodo de <i>CESIM</i>	59
7.4.1.	Óxido de grafeno reducido	59
7.4.2.	Polimerización de Rojo Neutro	65
7.5.	Evaluación del efecto de la 3ª cámara y el efecto de la modificación del cátodo sobre la concentración, purificación y producción de <i>H₂Succ</i>	72
7.5.1.	Efecto de la tercer cámara.....	72
	Conclusion	74
8.	Bibliografía	75
9.	Anexos	78
	Anexo 1. Diseño de placas de acrílico	78
	Anexo 2. Diseño del puerto de muestro	79
	Anexo3. Circuito y fuente de poder utilizada para administrar voltaje al sistema ...	79

Anexo 4. Esquema del arreglo de la celda de 3 cámaras	80
Anexo 5. Proceso de síntesis de óxidos de grafeno por Hummer's modificado.	81
Anexo 6. Arreglo del sistema de tres electrodos para la polimerización del rojo neutro	82
Anexo 7. Curvas de calibración de <i>H2Succ</i> y concomitantes.....	83

II. ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PROPIEDADES DEL ÁCIDO SUCCINICO.....	18
TABLA 2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE A. SUCCINOGENES	21
TABLA 3. PROPIEDADES DEL ROJO NEUTRO	23
TABLA 4. PARÁMETROS DE ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE FORSU	33
TABLA 5. PARÁMETROS DE ANÁLISIS DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SUCCÍNICO EN LA CELDA DE ELECTROSÍNTESIS MICROBIANA.....	36
TABLA 6. DISEÑO EXPERIMENTAL DE <i>CESIMs</i>	39
TABLA 7. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES PARA EVALUAR EL NÚMERO DE CÁMARAS EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SUCCÍNICO A PARTIR DE HIDROLIZADO DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS.....	40
TABLA 8. CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS	44
TABLA 9. CONTENIDO EN LAS DIFERENTES CÁMARAS DE LOS ÁCIDOS	46
TABLA 10. VALORES DE CONDUCTIVIDAD DE LAS SOLUCIONES EN LAS DIFERENTES CÁMARAS	57
TABLA 11. RELACIÓN ATÓMICA O/C DE LAS MUESTRAS DE GRAFITO, ÓXIDO DE GRAFENO Y FIELTRO DE GRAFITO.....	65
TABLA 12. TABLA COMPARATIVA DE LAS <i>CESIM3</i> Y 2 CÁMARAS (PONER DESV ESTÁNDARES)	72
TABLA 13. RELACIÓN DE <i>H2SUCC</i> CON PRODUCTOS CONCOMITANTES Y AZÚCARES.....	73

III. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA. 1 RUTAS METABÓLICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SUCCÍNICO. 1 FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXIQUINASA, 2 MALATO DESHIDROGENASA, 3 FUMARATO REDUCTASA, 4 PIRUVATO QUINASA, 5 PIRUVATO FERREDOXIN OXIDOREDUCTASA, 6 ACETATO CINASA, 7 ALCOHOL DESHIDROGENASA, 8 LACTATE DESHIDROGENASA TOMADO DE (ZEIKUS ET AL., 1999).....	20
FIGURA. 2. ESQUEMA DE PLAN DE TRABAJO	30
FIGURA. 3. MODIFICACIONES A LA CELDA Y ELECTRODOS PARA SER UTILIZADOS EN LA CESIM. DE IZQUIERDA A DERECHA SE OBSERVA EL CONECTOR UTILIZADO Y MODIFICADO, LOS ORIFICIOS ADICIONALES ELABORADOS CON EL CONECTOR Y A LA DERECHA EL CONECTOR UNIDO CON EL ELECTRODO DE REFERENCIA	42
FIGURA. 4. MODIFICACIONES AL DISEÑO DE LA CESIM.....	43
FIGURA. 5 CEPA <i>ACTINOBACILLUS SUCCINOGENES</i> CRECIDA EN PLACA DE TRIPTICASEINA SOYA Y TINCIÓN DE GRAM 1000X	45
FIGURA. 6 SEGUIMIENTO DE PH EN LA CESIM3 CON MEMBRANA ZIRFON.....	46
FIGURA. 7 GRÁFICAS DE AZÚCARES REDUCTORES EN LAS DIFERENTES CÁMARAS Y BIOMASA PARA LA CESIM3 (A), LA CESIM2 (B) Y LA FERMENTACIÓN CONVENCIONAL (C).....	49
FIGURA. 8 CINÉTICA DE LOS PRINCIPALES AZÚCARES Y PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN EN LA CESIM3, EN LAS DIFERENTES CÁMARAS A CÁMARA INTERMEDIA, B CÁMARA CATÓDICA, C CÁMARA ANÓDICA.....	52
FIGURA. 9 CINÉTICA DE LOS PRINCIPALES AZÚCARES Y PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN EN LA CESIM2, EN LAS DIFERENTES CÁMARAS A CÁMARA CATÓDICA, B CÁMARA ANÓDICA. .	54
FIGURA. 10 CINÉTICA DE LOS PRINCIPALES AZÚCARES Y PRODUCTOS DURANTE LA FERMENTACIÓN CONVENCIONAL.....	55
FIGURA. 11 CINÉTICA DE PH DURANTE EL TIEMPO DE FERMENTACIÓN DE LA CESIM3 MEMBRANA FUMASEP	56
FIGURA. 12 SEGUIMIENTO DE VOLTAJE, CORRIENTE Y CÁLCULO DE POTENCIA DE CESIM DE 3 CÁMARAS.....	58
FIGURA. 13 SEGUIMIENTO DE VOLTAJE, CORRIENTE Y CÁLCULO DE POTENCIA DE CESIM DE 3 CÁMARAS.....	58
FIGURA. 14 DIFRACTOGRAMA DEL GRAFITO Y EL ÓXIDO DE GRAFENO, EN LA PARTE INFERIOR	

LOS PICOS CORRESPONDIENTES A LA CARTA CRISTALOGRÁFICA 96-120-0018.....	59
<i>FIGURA. 15</i> MICROGRAFÍAS SEM DEL GRAFITO 1 Y ÓXIDO DE GRAFENO 2.....	61
<i>FIGURA. 16</i> SE MUESTRAN LOS FRAGMENTOS DE ELECTRODO SUMERGIDO EN LA SOLUCIÓN DE GO 1MG/ML.....	61
<i>FIGURA. 17</i> FIELTRO DE GRAFITO CF Y FIELTRO DE GRAFITO CON GO SOBRE LAS FIBRAS (CF+GO).....	62
<i>FIGURA. 18.</i> CRONOAMPEROMETRÍA PARA LA REDUCCIÓN ELECTROQUÍMICA DEL GO SOBRE EL CF.....	63
<i>FIGURA. 19</i> MICROGRAFÍAS DE FIELTRO DE GRAFITO CON RGO SOBRE LOS MISMOS.....	64
<i>FIGURA. 20.</i> VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA DE LA ACTIVACIÓN DE CF.....	66
<i>FIGURA. 21.</i> CRECIMIENTO DEL POLÍMERO DE ROJO NEUTRO SOBRE GLASSY CARBON.....	67
<i>FIGURA. 22</i> POLIMERIZACIÓN DE NR SOBRE PLATINO A, POLIMERIZACIÓN DESPUÉS DE SECARSE B, Y POLIMERIZACIÓN OBSERVADA A MICROSCOPIO ESTEREOSCÓPICO DEL FIELTRO DE GRAFITO C.....	67
<i>FIGURA. 23</i> VOLTAMETRÍA CÍCLICA “TIPO” DE LA POLIMERIZACIÓN CON ROJO NEUTRO EN FIELTRO DE GRAFITO NORMALIZADO POR M ³ . SE OBSERVAN PICOS A -0.1V QUE SE DESPLAZA HASTA 0.09 Y 0.36 QUE CRECE A 0.63.....	68
<i>FIGURA. 24</i> FIELTRO DE GRAFITO ANTES Y DESPUÉS DE LA POLIMERIZACIÓN DEL ROJO NEUTRO.....	69
<i>FIGURA. 25.</i> FIELTRO DE GRAFITO RECUBIERTO CON ROJO NEUTRO POLIMERIZADO.....	70
<i>FIGURA. 26</i> ANÁLISIS DE RAMAN DEL CF, G Y CF +PNR. LAS LÍNEAS VERTICALES NEGRAS CORRESPONDEN A ANILLOS QUINONICOS Y A ENLACES C=C Y C=N.....	71
<i>FIGURA. 27</i> DISEÑO DE PLACAS DE ACRÍLICO PERFORADAS PARA LA CESIM ADAPTABLE A 2 Y 3 CÁMARAS.....	78
<i>FIGURA. 28.</i> DIAGRAMA DE DISEÑO DEL PUERTO DE MUESTREO PARA CADA CÁMARA DE LA CESIM.....	79
<i>FIGURA. 29.</i> DIAGRAMA DE CIRCUITO DE LA FUENTE DE PODER VARIABLE.....	79
<i>FIGURA. 30.</i> DIAGRAMA DESCRIPTIVO DE LA CONFIGURACIÓN Y CONTENIDO DE LA CELDA DE ELECTROSÍNTESIS MICROBIANA DE 3 CÁMARAS.....	80
<i>FIGURA. 31.</i> DESCRIPCIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÓXIDO DE GRAFENO SIGUIENDO EL MÉTODO DE HUMMERS MODIFICADO. ADAPTADO DE HUMMERS (<i>HUMMERS & OFFEMAN, 1958</i>) POR (<i>MARDIANA ET AL., 2015</i>).	81

FIGURA. 32. CELDA DE TRES ELECTRODOS UTILIZADA PARA LA POLIMERIZACIÓN DEL COLORANTE ROJO NEUTRO (A) VISTA GENERAL (B) DETALLE DE ELECTRODOS.....	82
FIGURA. 33. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO SUCCÍNICO POR HPLC	83
FIGURA. 34. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO POR HPLC.....	83
FIGURA. 35. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO FÓRMICO POR HPLC	84

IV. NOTACIÓN

AR	Azúcares reductores
BES	Sistemas bioelectroquímicos
CCM	Celda de combustible microbiano
CESIM	Celda de electrosíntesis microbiana
CESIM2	Celda de electrosíntesis microbiana arreglo de 2 cámaras
CESIM3	Celda de electrosíntesis microbiana arreglo de 3 cámaras
CF	Filtro de grafito
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DO ₆₆₀	Densidad óptica a 660 nm
E	Potencial: voltaje de la fem aplicada a la CESIM
E _{aplicada}	Energía aplicada a la CESIM durante el tiempo de operación
E _{electr}	Energía eléctrica utilizada en la fermentación, en kJ
EDS	Espectrometría de dispersión de energía de rayos X
E _{f ext}	Eficiencia de extracción
FORSU	Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos
G	Grafito
H ₂	Hidrógeno
H ₂ Succ	Ácido succínico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
I	Intensidad de corriente en la CESIM
MES	Microbial electrolysis cell
MFC	Microbial Fuel Cell o celda de combustible microbiana
MESynC	Microbial electrosynthesis cell
m _{H₂Succ,gen}	Masa de H ₂ Succ producida, expresada en kg o mol
m _{is}	Masa inicial del sustrato en kg o mol
m _{uS}	Masa de sustrato consumido en kg o mol
MIA	Membrana de intercambio aniónico
MIC	Membrana de intercambio catiónico
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida
NF-117	Membrana de intercambio protónico Nafion

Ni	Níquel
OFMSW	Organic fraction of municipal solid waste
P	Potencia suministrada a la CESIM
Pd	Paladio
PEP	Fosfoenol piruvato del nombre en inglés
PAD	Pretratamiento con ácido diluido
PBS	Buffer fosfato salino
PNR	Polímero de Rojo Neutro
RAMAN	La espectroscopia Raman basado en el efecto RAMAN
R ²	Coeficiente de determinación
rGO	Oxido de grafeno reducido
RN	Rojo Neutro
SEM	Microscopia electrónica de barrido
UFC	Unidades formadoras de colonias
XRD	Difracción de rayos X

V. RESÚMEN

El ácido succínico (H_2Succ) es un producto de valor agregado, conocido como un “precursor”, ya que se puede transformar en una amplia gama de productos químicos utilizados en las industrias alimenticia, de solventes, de plásticos, entre otras. El proceso de separación y purificación del H_2Succ consiste en el 50% al 80% del costo final del producto. El H_2Succ es producido típicamente por vía petroquímica, aunque ha recibido una atención creciente en los últimos años su producción por fermentación microbiana. Las celdas de electrosíntesis microbiana ($CESIM$) consumen energía eléctrica que provee de poder reductor adicional para que los microorganismos puedan generar compuestos químicos útiles como el ácido succínico.

Los objetivos de este trabajo fueron los siguientes: (i) evaluar el efecto del número de cámaras sobre el desempeño de una $CESIM$ en la producción y purificación de H_2Succ , y (ii) implementar modificaciones al cátodo de una $CESIM$ utilizando técnicas de nanotecnología. Se construyó y usó $CESIM$ de 2 y 3 cámaras escala laboratorio. El sustrato utilizado fue hidrolizado de la fracción orgánica de residuos urbanos. Se probaron dos membranas aniónicas para separar la cámara catódica de la cámara intermedia la membrana Zirfon® y la Fumasep® FAA3-PK-130 en la $CESIM$ de 3 cámaras. Se modificaron electrodos de fieltro de grafito con óxido de grafeno reducido y polímero de Rojo Neutro.

La $CESIM$ 3 con membrana Zirfon® no transfirió el H_2succ ni ningún otro producto de fermentación a la cámara intermedia, mientras que la $CESIM$ 3 con la membrana Fumasep® presentó una transferencia positiva de H_2Succ . La $CESIM$ 3 con membrana Fumasep presentó un rendimiento de $0.171 \text{ g } H_2Succ/g \text{ AR consumida neta}$, la energía total del sistema fue de 1.36 kJ y transfirió el H_2succ y los productos concomitantes a la cámara intermedia en el orden $HFor > HAc > H_2Succ$. Presentó un Índice $\epsilon_{H_2Succ/ee}$ 0.36 g/kJ . Por su parte la $CESIM$ 2 tuvo rendimiento fue de $0.24 \text{ g } H_2Succ/g \text{ AR consumida neta}$ y la energía total en el sistema fue de 1.59 kJ y un Índice $\epsilon_{H_2Succ/ee}$ 0.424 g/kJ . El electrodo modificado con rGO presentó las láminas del rGO rodeando las fibras. El electrodo modificado con PNR tuvo un cambio de coloración y se observó el polímero rodeando las fibras.

La $CESIM$ de 3 cámaras con membrana Zirfon® no transfirió el ácido succínico a la cámara intermedia. La $CESIM$ 3 equipada con membrana Fumasep® presentó transferencia de H_2Succ y compuestos concomitantes, aunque no se concentró el primero. La $CESIM$ de 2 cámaras tuvo mejor rendimiento de ácido succínico y uso de energía que la celda de 3 cámaras. Nuestros resultados no validaron la hipótesis conceptual de concentrar y purificar el H_2succ en una cámara intermedia en las condiciones de fermentación. Se logró modificar electrodos de fieltro de grafito con rGO y PNR con perspectivas a ser evaluadas en una $CESIM$.

VI. ABSTRACT

Succinic acid (H_2Succ) or butanedioic acid is known to be a "precursor" of several synthesis processes; it can be transformed into a wide range of products that can be used in the food, solvents, and plastics/polymer industries, among others. The H_2Succ is a value-added product and to some extent its relatively high cost is related to the separation and purification processes that can account for 50% to 80% of the final cost. H_2Succ is typically produced by petrochemical means, although its microbial production is receiving an increasing attention in recent years. The microbial electrosynthesis cells ($MESynC$) consume electrical energy to boost reducing power in order to the biocatalysts to synthesize more chemical compounds of interest as succinic acid.

The objectives of this work were the following: (i) evaluate the effect of the number of chambers on the performance of a $MESynC$ in the production and purification of H_2Succ , and (ii) implement modifications to the cathode of a $MESynC$ using nanotechnology techniques. A $MESynC$ with 2 and 3 chambers laboratory scale cell was built and used. The substrate used was hydrolyzed from the organic fraction of urban waste. Two anionic membranes were tested to separate the cathode chamber from the intermediate chamber, the Zirfon® membrane and the Fumasep® FAA3-PK-130 in the 3-chamber $MESynC$. Graphite felt electrodes were modified with reduced graphene oxide and Neutral Red polymer.

The $MESynC$ 3 with Zirfon® membrane did not transfer the H_2Succ or any other fermentation products to the intermediate chamber, while the $MESynC$ 3 with the Fumasep® membrane presented a positive transfer of H_2Succ . The $MESynC$ 3 with Fumasep membrane presented a yield of $0.171 \text{ g } H_2Succ / \text{g } AR \text{ consumed}$, the total energy of the system was 1.36kJ, H_2Succ and the concomitant products were transferred to the intermediate chamber in the order $HFor > HAc > H_2Succ$. It presented a $\epsilon_{H_2Succ/ee}$ $0.36 \text{ g} / \text{kJ}$ Index. For the $MESynC$ 2 the yield, *the electrical energy consumed* and $\epsilon_{H_2Succ/ee}$ index were $0.24 \text{ g } H_2Succ / \text{g } RS \text{ consumed}$, 1.59 kJ and 0.424g/kJ , *respectively; therefore, 3c-cell had 25% lower performance in terms of the yield.* The rGO modified electrode presented the rGO sheets surrounding the fibers. The PNR modified electrode had a change in color and the polymer was observed surrounding the fibers.

In summary, the 3-chamber $MESynC$ with Zirfon® membrane did not transfer the succinic acid to the intermediate chamber. The $MESynC$ 3 equipped with Fumasep® membrane presented transfer of H_2Succ and concomitant compounds, although the first one was not concentrated. The 2-chamber $MESynC$ had better succinic acid performance and energy use than the 3-chamber cell. Our results did not validate the conceptual hypothesis of concentrating and purifying H_2Succ in an intermediate chamber under fermentation conditions. It was possible to modify graphite felt electrodes with rGO and PNR with perspectives to be evaluated in a $MESynC$.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1. Ácido succínico

El ácido succínico (*H₂Succ*) o ácido butanodioico es un cristal incoloro, soluble en agua, etanol y acetona. El ácido succínico se puede presentar en forma de sal de succinato ionizado o en forma de ácido.

El *H₂Succ* es conocido como un “precursor” ya que se puede transformar en una amplia gama de productos químicos y puede usarse como intermediario químico para la producción de lacas y ésteres de perfumes, puede usarse como un agente de sabor, bacteriostático o neutralizante en la industria alimentaria. Además, tiene un mercado químico especial para la producción de recubrimientos, surfactantes, tintes, detergentes, solventes verdes, plásticos biodegradables e ingredientes que estimulan el crecimiento de animales y plantas.

Además, por su estructura química, ácido dicarboxílico lineal y saturado; el ácido succínico puede convertirse fácilmente en otros productos químicos a granel, como el 1, 4-butanodiol, gamma-butirolactona, tetrahidrofurano, ácido adípico, n-metilpirrolidona o ésteres alifáticos lineales (Beauprez, De Mey, & Soetaert, 2010; Zeikus, Jain, & Elankovan, 1999).

Recientemente se le han atribuido implicaciones ambientales en la fabricación de plásticos, por lo cual se espera que la demanda de ácido succínico aumente significativamente. Los nuevos polímeros biodegradable como el poli (succinato de 1,3-propileno), puede derivarse por policondensación térmica del ácido succínico con 1,3-propanodiol.5. También se puede utilizar para la producción de poli (succinato de butileno) biodegradable (PBS) con excelentes propiedades térmicas y mecánicas, así como procesabilidad termoplástica utilizando el 1,4-butanodiol, 6-8 derivado de ácido succínico (Ranucci, Liu, Söderqvist, & Albertsson, 2000; Xu & Guo, 2010).

También forma parte de diferentes rutas metabólicas, participa como un intermediario en la ruta de los ácidos tricarboxílicos y del ciclo del glioxilato. Además es un producto final de fermentación en condiciones anaerobias (Zeikus et al., 1999).

El *H₂Succ* tiene un precio en el mercado de U.S. \$ 2.00-8.0 por kg dependiendo de su pureza y se puede considerar como producto de valor agregado. Se proyecta

que el mercado del ácido succínico alcance un valor de \$1100 millones de dólares y 476.9 miles de toneladas para el 2022, mercado que creció últimamente por el desarrollo de plásticos biodegradables (Analyst, n.d.).

Las características generales del ácido succínico de muestran en la tabla 1

Tabla 1. Propiedades del ácido succinico

Propiedad	Valor
Fórmula	C ₄ H ₆ O ₄
Peso molecular	118.09 g/mol
Punto de fusión	186°C
Punto de ebullición	235°C
Solubilidad en agua a 25°C	83g/l

1.2. Síntesis química

La síntesis petroquímica es el método para producir ácido succínico más utilizado, se realiza mediante la hidrogenación catalítica del anhídrido maléico a anhídrido succínico utilizando catalizadores de Ni o Pd, seguido de una hidratación a ácido succínico (Pinazo, Domine, Parvulescu, & Petru, 2015). El proceso tiene eficiencias de conversión mayores al 90%.

1.3. Producción por vía fermentativa y empresas

Como alternativa a la producción por síntesis petroquímica se ha desarrollado la producción de *H₂Succ* por vía de fermentación. La ruta de fermentación convierte oxalacetato en malato, a fumarato, y luego succinato utilizando cuatro enzimas clave que convierten al PEP mediante la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, malato deshidrogenasa, fumarasa y fumarato reductasa en ácido succínico (Der Werf, Guettler, Jain, & Zeikus, 1997; Zeikus et al., 1999).

En la actualidad existen empresas, conjuntos comerciales y actividades de investigación y desarrollo para la producción de *H₂Succ*. Entre ellas se encuentra BioAmber que ha construido una planta de demostración en Pomacle, Francia, con una capacidad de 2000 toneladas por año, por su parte DSM y Roquette construyeron una planta a gran escala con una capacidad de 10 000 toneladas por año que comenzó

su producción comercial en 2012, Myriant, un sucesor de BioEnergy International construyó una planta de ácido succínico con una capacidad inicial de 13 500 toneladas por año en Louisiana, Reverdia con Biosuccinium y BASF también se dedican a la producción de ácido succínico a partir de fuentes bióticas (Cheng, Zhao, Zeng, & Zhang, 2012; NNFFCC, n.d.; Technology, n.d.)

Durante la fermentación anaerobia, dependiendo del organismo se pueden formar otros metabolitos como etanol, acetato, lactato y formiato lo que dificulta la separación y purificación del ácido succínico de los productos concomitantes (Der Werf et al., 1997; Zeikus et al., 1999). La etapa de separación y purificación del *H2Succ* es la más costosa del proceso de obtención de *H2Succ* por medio de fermentación, siendo del 50% al 80% del costo final del producto (Fu et al., 2014).

1.4. Microorganismos que producen ácido succínico

Existen diversos organismos que pueden producir *H2Succ* por fermentación; los hongos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Byssoschlamys nivea*, *Lentinus degener*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium viniferum* y levadura *Saccharomyces cerevisiae*, entre las bacterias Gram-positivas se encuentran *Corynebacterium glutamicum* y *Enterococcus faecalis* (Song & Lee, 2006). Las bacterias aisladas del rumen, incluidas *A. succinogenes* y *M. succiniciproducens*, son las mejores candidatas para la producción de ácido succínico, ya que producen ácido succínico como principal producto de fermentación (Guettler, Rumler, & Jainf, 1999b). Entre los organismos que resaltan como productores de ácido succínico se encuentran *Anaerobiospirillum succiniciproducens* y varias cepas recombinantes de *E. coli*. En la figura 1. se muestra la ruta metabólica de la fermentación para la producción de ácido succínico por *A.*

succinogenes.

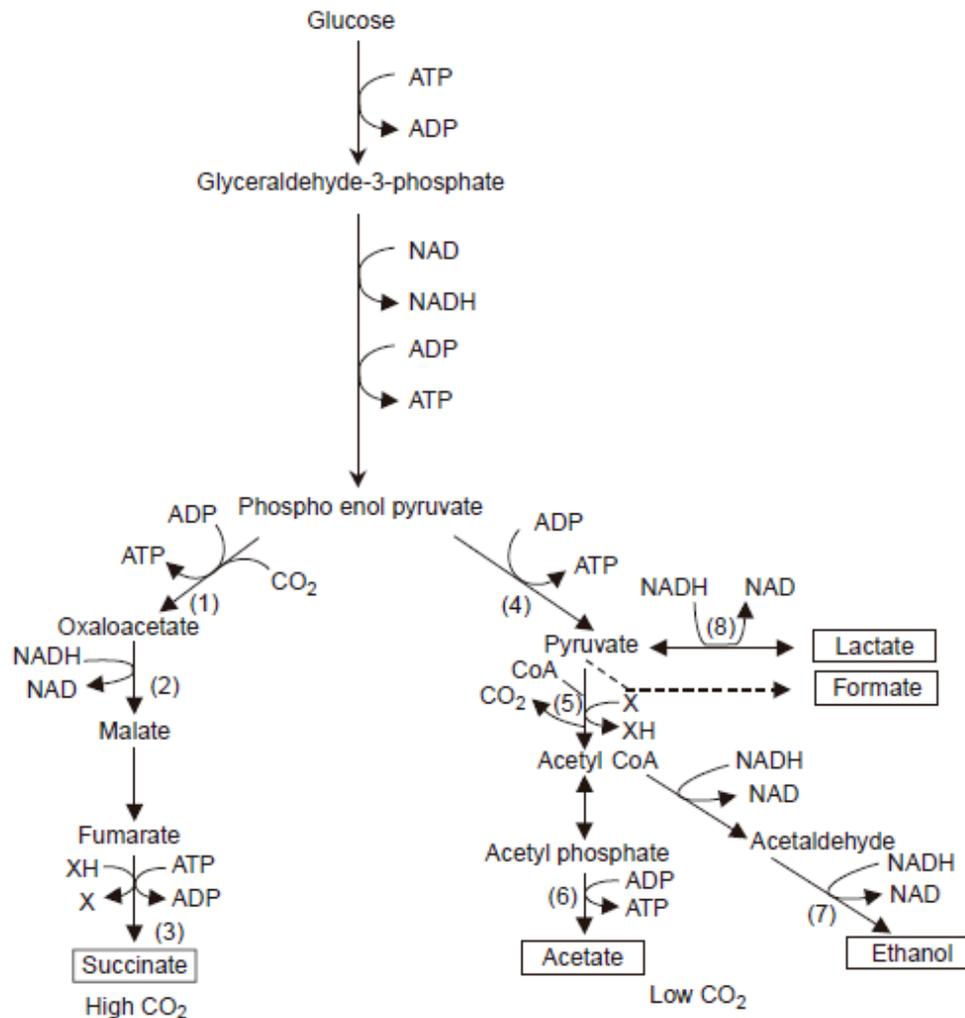


Figura. 1 Rutas metabólicas para la producción de ácido succínico. 1 fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, 2 malato deshidrogenasa, 3 fumarato reductasa, 4 piruvato quinasa, 5 piruvato ferredoxin oxidoreductasa, 6 acetato cinasa, 7 alcohol deshidrogenasa, 8 lactate deshidrogenasa tomado de (Zeikus et al., 1999)

Actinobacillus succinogenes, ficha taxonómica en la tabla 2, es reconocido como uno de los mejores productores de H_2Succ , la cepa 130Z es una bacteria Gram-negativa de la familia Pasteurellaceae, anaerobia facultativa, osmotolerante, mesofílica que utiliza una amplia fuente de azúcares como L-arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa, sucrosa, D-xilosa (Guettler et al., 1999b).

Tabla 2. clasificación taxonómica de *A. succinogenes*

Categoría	
Dominio	Bacteria
Reino	Eubacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Pasteurellales
Familia	Pasteurellaceae

1.5. 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, Nahvi, & Karimi, 2015). La FORSU comprende de una mezcla de residuos vegetales 60% y residuos de papel en 40%. Es una alternativa en comparación de otros sustratos más caros o que pueden interferir con la seguridad alimenticia, como el azúcar. Actualmente existen muchos desafíos para producir exitosamente algún compuesto químico a partir de residuos lignocelulósicos, por su origen vegetal mayoritario; por ejemplo, el rendimiento en la liberación de azúcares, la disminución de costos, alcanzar un proceso de separación sostenible, obtener el producto con la pureza requerida, lograr un alto rendimiento de recuperación además de la competencia con los compuestos químicos derivados del petróleo (Salvachúa et al., 2016), es por ello que es una buena alternativa como sustrato para la obtención de bioproductos por fermentación.

La sacarificación de la FORSU u otro material lignocelulósico por pretratamiento con ácido diluido (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 (X. Yu, Zheng, Dorgan, & Chen, 2011). Por lo que se deben destoxificar para eliminar estos inhibidores.

1.6. Sistemas bioelectroquímicos

Los sistemas bioelectroquímicos (*BES*) son una tecnología que combina la

biotecnología con la electroquímica que se pueden clasificar en dos tipos: las que usan enzimas y las que usan microorganismos vivos (Hamelers & Heijne, 2010). Los segundos se clasifican en dos tipos, celdas de combustible microbiana (*CCM*) y electrosíntesis microbiana (*CESIM*); donde las primeras generan energía eléctrica a partir de sustratos orgánicos mientras las segundas la consumen eléctrica.

1.7. Celdas de electrosíntesis microbiana

Las celdas de electrosíntesis microbiana son una biotecnología emergente que requiere la administración de corriente eléctrica con el objetivo de obtener un producto, con los microorganismos como biocatalizador. Compuestos orgánicos solubles, CO_2 u otras fuentes de carbono se pueden reducir para generar compuestos orgánicos excretados por las células (Hernández-Correa et al., 2017; Rabaey & Rozendal, 2010; Zhao et al., 2016) En estas los microorganismos aceptan electrones desde el cátodo para la reducción a productos.

Los productos de valor agregado son compuestos químicos con un alto precio de venta y una baja a moderada escala producción/consumo (Hernández-Correa, 2018). Entre los productos de valor agregado obtenidos a partir de *CESIM* se encuentran lactato, succinato, butirato, butanol, mientras que en “commodities” (compuestos más baratos y de producción masiva) se obtiene etanol, metano, acetato entre otros (Hernández-Correa et al., 2017).

La producción de *H₂Succ* se ha incrementado mediante el uso de un sistema bioelectroquímico *CESIM*; utilizando glucosa, xilosa, arabinosa e hidrolizado de olote donde se alcanzó un incremento en 1.333 veces (Zhao et al., 2016), melazas de caña pretratadas con poliacrilamida donde se obtuvo hasta 83.67 g/L o 0.930 g g⁻¹ (Wang et al., 2018) y el uso de Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU) como fuente de carbono donde se alcanzó hasta .798g g⁻¹(Hernández-Correa, 2018).

En los sistemas bioelectroquímicos la transferencia de electrones del microorganismo al ánodo o del cátodo al microorganismo se lleva a cabo por diferentes mecanismos, transferencia directa y transferencia indirecta. Donde el primer mecanismo es una transferencia directa a través de proteínas de membrana en las células o por “nanowires” que son estructuras similares al pili por donde se transfieren los electrones. La transferencia indirecta es a través de compuestos donadores de

electrones o a través de mediadores, los primeros incluyen al H_2 , formiato, amonio, o fierro II que no necesariamente se reducen en otro ciclo, mientras que la transferencia por mediador son especies químicas que funcionan como lanzaderas, es decir se reducen en el electrodo y se reducen con los microorganismos (Hernández-Correa et al., 2017; Tremblay, Angenent, & Zhang, 2017)

1.8. Mediador uso y características

La obtención de H_2Succ mediante fermentación requiere 2 moles de NADH por mol de succinato producido, lo que es un obstáculo importante para el alto rendimiento de succinato ya que se tiene una limitación de NADH y 1 mol de glucosa puede proporcionar solo 2 moles de NADH a través de la ruta glucolítica. Por lo tanto, el máximo rendimiento teórico molar de succinato a partir de glucosa está limitado a 1 mol mol⁻¹ glucosa suponiendo que todo el flujo de carbono pasará por el succinato nativo vía fermentativa (Der Werf et al., 1997; Zeikus et al., 1999). El poder reductor se favorece mediante la aplicación de energía eléctrica en una *CESIM* y para transferir los electrones del cátodo a *A. succinogenes* se utiliza para la fermentación un mediador que le confiere el poder reductor necesario para que no se limite el rendimiento de succinato.

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 (McKinlay & Zeikus, 2004; Qiu et al., 2009) en la tabla 3. El rojo neutro reducido eléctricamente puede reducir químicamente NAD y reemplazar la menaquinona como el donador de electrones del cátodo a la cadena de transporte de electrones para el funcionamiento de la fumarato reductasa. El rojo neutro (NR) es reducido eléctricamente y posteriormente se oxida por vía microbiana que se ha demostrado que la transferencia de electrones entre las formas oxidadas y reducidas es reversible (Doo Hyun Park & Zeikus, 2000). Además (D. H. Park, Laivenieks, Guettler, Jain, & Zeikus, 1999) demostró que *Actinobacillus succinogenes* puede crecer, reduciendo fumarato a succinato, con el rojo neutro como donador de electrones.

Tabla 3. Propiedades del Rojo neutro

Propiedad	Valor
Fórmula	C ₁₅ H ₁₇ CIN ₄
Peso molecular	288.78 g/mol
Punto de fusión	290°C
Punto de ebullición	497.3°C
Solubilidad en agua a 25°C	50 g/l
Rango de pH (rojo a amarillo)	6.8-8.0
Potencial REDOX	-0.33V

1.9. Separación del ácido succínico del medio de fermentación

Un proceso típico para la producción de un bioproducto, como el ácido succínico, por fermentación microbiana consiste en el cultivo de inóculos, la fermentación, la recuperación del producto, la concentración y la purificación (Song & Lee, 2006). El proceso de recuperación y purificación del producto equivale a la mayor proporción del costo final del producto (Zeikus et al., 1999)

Los obstáculos que se deben superar para la recuperación del *H₂Succ* se deben a que cuando se produce se libera al medio de crecimiento donde existe en forma de sal de succinato ionizado en una mezcla que incluye carbohidratos, proteínas y aminoácidos son en su mayoría no ionizados. Por lo tanto se obtiene una baja concentración en el caldo de cultivo, además, la presencia de productos concomitantes como otros ácidos carboxílicos (ácido acético y fórmico) dificulta su separación (Orjuela, Yanez, Peereboom, Lira, & Miller, 2011).

Existen varias formas de purificación como la precipitación de sales de succinato añadiendo dihidróxido de calcio, donde el *H₂Succ* se recupera por filtración y se convierte en ácido succínico añadiendo ácido sulfúrico. Mejorando la pureza del ácido succínico del 44.5% en el caldo de fermentación al 94.2% (p / p). Otro método de purificación es la electrodiálisis convencional seguido de pilas de membrana de electrodiálisis de división de agua, que elimina la mayor parte del catión de sal y produce una corriente de ácido altamente puro proceso que se integra con resinas de intercambio catiónico y aniónico para su purificación final (Song & Lee, 2006).

Las membranas de intercambio iónico son un componente importante para la

desalinización de agua y procesos de electrolisis, estas membranas tienen selectividad para iones. Las selectividades más comunes son hacia iones positivos por las membranas de intercambio catiónico (MIC) o hacia iones negativos (MIA) (Luo, Abdu, & Wessling, 2018).

Una *CESIM* con una configuración de tres cámaras (anódica, catódica e intermedia), es una alternativa que permitiría una producción, extracción y concentración simultánea del ácido acético. La fuerza electromotriz impulsó la migración del ácido acético de la cámara catódica hasta la cámara intermedia atravesando una membrana de intercambio aniónico (MIA) para concentrar el ácido, superando de 2 a 3 veces la concentración obtenida por una fermentación convencional (Gildemyn et al., 2015), esta configuración permitiría la reducción de costos de extracción.

1.10. Nanotecnologización de cátodos en *CESIM*

(Doo Hyun Park & Zeikus, 2000) mencionaron que las mejoras en las celdas de combustible que podrían realizarse incluían inmediatamente mejorar la corriente aumentando el área de superficie del electrodo, inmovilizando las células en el electrodo y uniendo covalentemente el mediador de electrones en la superficie del electrodo. Y durante el desarrollo de las BES se han realizado modificaciones del electrodo en estos sentidos, con el objetivo de mejorar los rendimientos.

Distintos tipos de materiales se han utilizado en los electrodos de las *CESIM*, donde los materiales basados en carbono (incluyendo diferentes formas y tipos, como varilla, barra, tela, placa, carbón activado, carbón activado por difusión de gas, gránulos, varilla de fibra, fieltro de carbono y carbono vítreo reticulado) resaltan como los más utilizados para la conversión de CO₂ en productos de valor agregado (Aryal, Ammam, Patil, & Pant, 2017). Entre los materiales que se han desarrollado con el fin de disminuir los costos de los materiales utilizados en la electrofermentación para lograr que sea competitiva con otros métodos.

Por otra parte, la modificación de la superficie de estos materiales ha sido propuesta primero para el ánodo en celdas de combustible y posteriormente para la optimización del biocátodo. Entre las principales características que se busca implementar con las modificaciones se tiene las siguientes: mejorar la

biocompatibilidad, aumentar la relación superficie activa, estabilidad química, favorece la formación de la biopelícula e incrementar la conductividad eléctrica (Aryal et al., 2017).

La modificación del cátodo para la conversión CO_2 en *CESIM* en su mayoría ha sido aplicada para la producción de ácido acético como producto principal. Entre las modificaciones que se han realizado en el cátodo incluyen adición de quitosan, polyanilina, melamina, oro, paladio, níquel, *rGO*, grafeno, óxidos de fierro, entre otros (Aryal et al., 2017; T. Zhang et al., 2013)

El óxido de grafeno reducido (*rGO*) es un material de carbono bidimensional, con forma de panal y un átomo de espesor con muchas características sobresalientes, como bajo costo de producción, alta conductividad electrónica, baja resistencia a la transferencia de carga, gran superficie específica y excepcional resistencia mecánica y biocompatibilidad que podrían ser beneficiosas para la productividad de MES y escalabilidad (L. Chen, Tremblay, Mohanty, Xu, & Zhang, 2016) lo que lo hace una buena alternativa para aumentar la relación área superficie.

Por su parte el uso películas no tóxicas y semiconductoras como las formadas por poli neutro rojo (*PNR*) induce altas corrientes catalíticas en reacciones enzimáticas. Estudios en electrodos y aplicación de ellos sobre el desarrollo de sensores y células de biocombustibles han sido hechos extensamente. El desarrollo de estas películas es importante ya que el sistema que funciona con el mediador, donador de electrones, fuertemente inmovilizado en el electrodo. Se ha realizado la inmovilización del NR utilizado como molécula mediadora REDOX directamente en el electrodo mediante un proceso de electropolimerización (Mardiana et al., 2015). Entre las ventajas que se consideran es que se evitara que el mediador se transfiera durante los ciclos de utilización de los MFC y también de *CESIM*.

2. JUSTIFICACIÓN

El ácido succínico (*H2Succ*) o ácido butanodioico es un conocido “precursor” para la obtención de productos derivados del mismo que incluyen diversas industrias. El desarrollo de la producción de *H2Succ* por vía fermentativa es una alternativa para la independencia del petróleo, y por su parte la electrofermentación podría mejorar los rendimientos de la fermentación convencional, haciéndola competitiva contra la síntesis petroquímica del *H2Succ*.

Además, el uso de un sustrato como la FORSU desvincula la producción biológica del *H2Succ* con productos de importancia alimenticia.

Sin embargo, proceso de producción de *H2Succ* en una *CESIM* aún enfrenta diferentes retos; entre ellos se encuentra la purificación del producto del medio de fermentación, aumentar el rendimiento, conseguir buenos desempeños con el aumento de escala, disminución en el requerimiento de energía térmica, entre otros. En este proyecto nos ocuparemos del primero con las 3 cámaras y del segundo con el uso de cátodo nanotecnologizado.

3. HIPÓTESIS

1. La *CESIM* de 3 cámaras permitirá concentrar y purificar el *H₂Succ* producido.
2. El cátodo de una *CESIM* se puede modificar con nanotecnología.

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del número de cámaras sobre el desempeño de una *CESIM* productora de ácido succínico.

4.2. Objetivos particulares

1. Construir *CESIM* de 3 cámaras, evaluar y comparar *CESIM* de 2 cámaras y 3 cámaras en la producción y purificación de *H₂Succ.*
2. Implementar modificaciones al cátodo de una *CESIM* utilizando técnicas de nanotecnología.

5. METODOLOGÍA

5.1. Plan de trabajo

El plan de trabajo del presente proyecto consta de 5 actividades (Figura 2) que se refieren al diseño y construcción de *CESIM*, la preservación, propagación de cepa, e inóculos, ensayos de *CESIM* de 3 cámaras, implementar nanotecnología en el cátodo de *CESIM*, y la evaluación del efecto de la 3ª cámara sobre la concentración, producción y purificación de *H2Succ*.

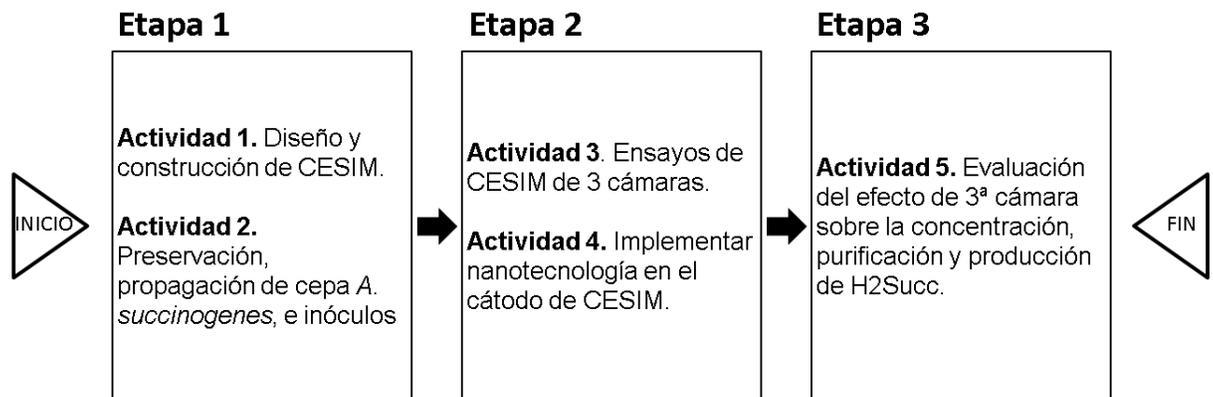


Figura. 2. Esquema de plan de trabajo

6. ACTIVIDADES

6.1. Actividad 1. Diseño y construcción de *CESIM*

Durante esta actividad se revisó la bibliografía para conocer los materiales necesarios para la nanomodificación del cátodo, los requerimientos para la construcción de las fuentes de poder usadas para llevar a cabo la electrofermentación y el material preexistente para la construcción de la *CESIM*.

6.1.1. Propósito

Esta actividad cumple con el propósito de proyectar las necesidades de materiales, así como su adquisición y la construcción de la celda, los cuales serán utilizados en las siguientes actividades como evaluar el efecto de la tercera cámara y la aplicación de nanotecnología en el cátodo sobre la producción y purificación del

H₂Succ.

6.1.2. Técnicas y procedimientos

Elaboración de electrodos de referencia de Ag/AgCl

Se utilizó dos alambres de plata de 1mm de grosor y aproximadamente 7 cm de largo, dos tubos de vidrio con un tapón de cerámica (Elaborados por el taller de vidrio del departamento de Química del CINVESTAV), niples de PET con cuerda de 1/8. Se realizó el electrodo según la metodología de Inamdar (2009). Se llevan a cabo con dos pasos, el recubrimiento del alambre de plata con AgCl y el ensamblaje del electrodo completo (Inamdar, Bhat, & Haram, 2009). En el primer paso el alambre de plata se sumergió en 0.1M HNO₃ para eliminar algún óxido de la superficie del metal y luego lavado con agua destilada. El recubrimiento del alambre se realizó sumergiendo el alambre en una solución de 0.05M KCl y conectándolo a la terminal positiva de una fuente aplicando 3V. se completa el circuito conectando la terminal negativa a un alambre de platino. El Voltaje fue aplicado por 10 minutos o hasta que el alambre estuviera completamente recubierto con una capa grisácea de cloruro de plata. El tubo de vidrio se rellenó con una solución de KCl saturada y se insertó el alambre de plata. La parte superior del tubo se selló con unos tapones de goma. El niple de plástico se modificó cortando la zona de conexión a la manguera y con una broca se aumentó el tamaño del orificio para que entrara el tubo de vidrio. Posteriormente el tubo de vidrio se insertó en el niple modificado de manera que quedara fija al conector.

Para conectar los electrodos de referencia a la celda de manera que queden selladas se realizó otro orificio en las celdas de electrosíntesis microbiana.

Entre las modificaciones al material para la construcción de la *CESIM* se encuentran las siguientes. Se elaboraron placas de acrílico perforadas de 0.4cm que proporcionan mayor soporte y estructura a la membrana de separación entre las cámaras de la celda, el diseño se observa en el Anexo 1, se cortaron láminas perforadas de acero inoxidable para funcionar como donador de electrones del cátodo y facilitar la unión al exterior con la fuente de poder. Adicional a lo anterior se cortaron empaques de silicón de 1/64" a la medida de la celda y con los orificios necesarios para poder incorporar las láminas de acrílico.

Los puertos de muestreo anteriormente usados por el grupo de trabajo tenían

fugas, por lo cual se diseñó de un puerto de muestreo de nylamid con cuerda de 1/8" de un lado y con un cuello de botella similar a una botella serológica para que se pudiera cerrar con una engargoladora, se puede observar el diseño en el Anexo 2.

Otro de los materiales utilizados para correr la *CESIM* presuntiva fueron 3 fuentes de poder regulable según el circuito LM317 alimentadas por una fuente de Ag electronics de 12V con salida de cables con caimanes de aproximadamente 1 metro de largo según el circuito del Anexo 3.

6.2. Actividad 2. Preservación, propagación de cepa, e inóculos.

6.2.1. Propósito

El propósito de esta actividad es propagar la cepa de *Actinobacillus succinogenes* 130Z, que se utilizará para la producción de *H2Succ* en una *CESIM* y mantenerla durante el desarrollo del proyecto para inocular la celda de electrosíntesis microbiana.

6.2.2. Diseño experimental.

Se preparó medio para el crecimiento de la cepa en medio líquido y sólido Soya Trypticaseína e hidrolizado de FORSU para aclimatación al sustrato a utilizar en la *CESIM*, y se mantuvo una resiembra constante aproximadamente cada mes de los medios líquidos y cada semana de los cultivos en placa.

Características de los medios

Medio Soya Trypticaseína

La cepa se creció en botellas selladas anaeróticamente conteniendo 30 mL de medio de caldo de Soya Trypticaseína con CO₂ como fase gaseosa, conteniendo lo siguiente: 17.0 g/L de peptona de caseína, 3.0 g/L de peptona de soya, 5.0 g/L de NaCl, 2.5 g/L de K₂HPO₄, 2.5 g/L de dextrosa o en medio sólido de agar soya Trypticaseína.

Medio de hidrolizado de FORSU

Hidrolizado de FORSU destoxificado con carbón activado al 2% y adicionado con sales minerales: 15 g/L de extracto de levadura, 1.5 g/L de NaH₂PO₄·H₂O, 1.5 g/L de K₂HPO₄, 0.2 g/L de CaCl₂, 0.2 g/L de MgCl y 1 g/L de NaCl, se incubó a 37 °C,

Preservación

Se creció la cepa 24 h a 37 °C, posterior a la incubación se prepararon alícuotas de 0.5 ml que fueron colocadas en microtubos que contenían 0.5 mL de glicerol (v/v). Los viales serán almacenados a -70 °C.

Preparación de inóculo

Se cosecharon las células del medio de hidrolizado de FORSU 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 de NaCl, 0.22 g/L de KCl; 1.15 g/L de Na₂HPO₄, 0.2 g/L de KH₂PO₄. Se ajustó la biomasa inicial a 150 mg/L. Las células se resuspendieron en hidrolizado de FORSU destoxificado adicionada con sales minerales. El cultivo volumen de inoculación será del 10% del volumen de trabajo de la celda.

6.2.3. Programa de supervisión y análisis

Se caracterizará el hidrolizado antes y después de la destoxificación para Fenoles totales y azúcares reductores tabla 4.

Tabla 4. Parámetros de análisis y caracterización de FORSU

Parámetro	Método
pH	
Azúcares reductores	Miller (1959)
Fenoles totales	Graham (1992)

Se realizó la resiembra en placa con Agar Trypticaseína Soya para un reconocimiento de la morfología colonial de la cepa y una tinción de Gram como verificación de la morfología de la cepa recibida.

6.2.4. Técnicas y procedimientos

Se preparó un único lote de FORSU hidrolizado y destoxificado a partir de residuos alimenticios y papel, en una relación 60:40 en suficiente cantidad para proveer el presente trabajo. Se hidrolizó con Ácido sulfúrico al 3% por 15 minutos y 121°C, y se destoxificó con carbón activado al 2%. Se guardaron hasta su análisis y/o utilización.

6.3. Actividad 3. Ensayos preliminares de *CESIM* de 3 cámaras

6.3.1. Propósito

Esta actividad consiste en la construcción de una primera *CESIM* de 3 cámaras y 2 cámaras; y evaluar su comportamiento en el tiempo, en la concentración y purificación del producto deseado, *H2Succ* en la cámara intermedia.

6.3.2. Diseño experimental

Composición de cada cámara

En la cámara catódica: hidrolizado de FORSU adicionado con sales minerales 40 g/L de $MgCO_3$, 1.5 g/L de NaH_2PO_4 , 1.5 g/L de K_2HPO_4 , 0.2 g/L de $MgCl_2$, 0.2 g/L de $CaCl_2$, 1.0 g/L de $NaCl$, 5×10^{-3} g/L de D-(+)-Biotina y 0.0288 g/L de rojo neutro. El pH del medio se ajustó a 7.2 antes de esterilizar. La D-Biotina y el rojo neutro se esterilizó mediante un equipo de filtración a través de una membrana (0.22 μm) por separado. La cámara anódica fue cargada con la siguiente solución: 23.5 g/L de Na_2HPO_4 , 13.8 g/L de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 5.8 g/L de $NaCl$ y el pH se ajustará a 3. La cámara intermedia: estaba compuesta por las sales de la cámara catódica cuatro veces concentrado que consiste en 6 g/L de NaH_2PO_4 , 6 g/L de K_2HPO_4 , 0.8 g/L de $MgCl_2$, 0.8g/L de $CaCl_2$, 4.0 g/L de $NaCl$ y se ajustó el pH a 3 (K. Chen, Jiang, Wei, Yao, & Wu, 2010; Gildemyn et al., 2015; Liu et al., 2008; D. H. Park et al., 1999; Shen et al., 2014; J. Yu, Li, Ye, Yang, & Chen, 2010; Zhao et al., 2016)

Condiciones de 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 *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 CO_2 (a través de un filtro estéril de 0.22 μm) (Hernández-Correa, 2018). La *CESIM* de configuración de tres cámaras tenía dos tipos de membranas, membrana Nafion 117 ® entre la cámara anódica y la cámara intermedia, y membrana Zirfon ® o Fumasep ® entre la cámara intermedia y la cámara catódica. Se tendrá una condición control de la fermentación convencional en frascos serológicos sin aplicar electricidad. Se muestra el arreglo de la celda de 3 cámaras en el Anexo 4.

Activación de las membranas

Membrana de intercambio catiónico

La membrana Nafion ® se activó con lavados secuenciales a 80°C, el primer lavado fue con una solución al 3% (v/v) de peróxido de hidrógeno durante una hora, posterior un lavado con agua desionizada por una hora para hidratar la superficie y remover impurezas. Un tercer lavado fue aplicado en solución de H₂SO₄ 2M por una hora donde se remueven iones metálicos contaminantes de la superficie. El ultimo lavado fue en agua desionizada durante 1 hora donde se remueve el H₂SO₄ y se hidrata la membrana.

Membranas de intercambio aniónico

La membrana Zirfon ® se activó colocándola una hora en agua milliQ a 50°C.

La membrana Fumatech ® Fumasep se activó de la siguiente manera, se sumergió en solución 0.5M NaCl a 25°C por al menos 72 horas cambiando la solución varias veces. No se deja secar ya que puede generar microfracturas.

Ambas membranas se esterilizaron con alcohol al 70% previo a su incorporación a la *CESIM*.

6.3.3. Programa de supervisión y análisis

Se medirán los parámetros que incluyen *H2Succ*, productos concomitantes, biomasa por densidad óptica, el parámetro *H2Succ* se evaluará cada 12 horas, mientras la biomasa adherida al cátodo se evaluará al final del tiempo de fermentación hasta 72 horas como se observa en la tabla 5.

Tabla 5 Parámetros de análisis de producción de ácido succínico en la celda de electrosíntesis microbiana

Parámetro	Cámara catódica	Cámara anódica	Cámara intermedia	Electrodos	Método
<i>H₂Succ</i> y concomitantes	Cada 12 horas	Cada 12 horas	Cada 12 horas	NA	HPLC-RID
pH	Cada 12 horas	Cada 12 horas	Cada 12 horas	NA	
Biomasa suspendida	Cada 12 horas	Cada 12 horas	Cada 12 horas	NA	DO660
Biomasa adherida al cátodo	NA	NA	NA	Al final de la fermentación	Cuantificación de Proteína: método modificado de Hartree-Lowry (Van Eerten-Jansen et al.,2013)
Azúcares reductores	Cada 12 horas	Cada 12 horas	Cada 12 horas	NA	DNS(Miller.1959)
Voltaje y Corriente				Entre electrodos y a través del sistema	

Se realizará el análisis de los parámetros para cada una de las tres cámaras, excepto la biomasa adherida al electrodo que se realizará en la cámara anódica y la cámara catódica.

6.4. Actividad 4.

6.4.1. Propósito

El propósito fue probar y aplicar dos tipos de modificación a escala nanométrica del cátodo de manera que se aumente la relación área superficie y se modifique la interacción del microorganismo modelo con su mediador de electrones.

6.4.2. Diseño experimental

Esta actividad fueron dos procesos diferentes: la adición de óxidos de grafeno reducido (*rGO* por sus siglas en inglés reduced graphene oxide) y la polimerización del mediador (*PNR*), Rojo neutro, sobre el electrodo con *rGO*.

6.4.3. Programa de supervisión y análisis

Caracterización de las partículas de *rGO* por SEM, XRD y EDS.

Análisis de la polimerización del rojo neutro se hará voltamperometría cíclica donde los picos de corriente relacionados con la actividad REDOX del NR, microscopía SEM, XRD y EDS.

6.4.4. Técnicas y procedimientos

Síntesis de *rGO*

Se sintetizaron por el método de Hummers modificado que considera el uso de KMnO_4 adicional. Se preparó una mezcla de H_2SO_4 concentrado (360 ml) y H_3PO_4 (40 ml) a la cual se le añadió 3.0017g de polvo de grafito sintético $<20 \mu\text{m}$. La mezcla se enfrió usando un baño de hielo hasta 0°C . Se añadieron 18g KMnO_4 lentamente en partes manteniendo la temperatura de la reacción por debajo de 20°C . La reacción se calentó a 50°C y se agitó durante 14 h. La mezcla de reacción se enfriará a temperatura ambiente. Se adiciona una solución de H_2O (400 ml) con H_2O_2 (3 ml). Se obtiene una suspensión color café-amarillenta. La mezcla de reacción se deja agitando 7 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron lavados sucesivos con agua desionizada hasta obtener un pH neutro (Marcano et al., 2018). Se secó por liofilización la suspensión y el producto seco se tritura hasta formar un polvo fino, se muestra el procedimiento en el Anexo 5.

El fieltro de grafito fue limpiado previo a su utilización para la adición del *rGO* el

PNR y el uso de fieltro de grafito solo como electrodo. El procedimiento fue el siguiente, el fieltro se sumergió en una solución de 10% H_2O_2 A 90°C por 3 horas. Se lavó con agua desionizada y después se sumergió en una solución de HCl 10% a 90°C por 1 hora. Se lava con agua desionizada y finalmente se seca al 60°C al aire.

Adición de óxidos de grafeno reducidos se hizo por el método de “dipping” de Zhang (2016) con unas modificaciones. Consistió en preparar una suspensión del óxido de grafeno en agua desionizada (1mg/ml) sonicados por 1 hora, en lugar de una suspensión de 5mg/ml que luego se centrifuga por 5 min a 300rpm que luego se diluye a 1mg/ml. El fieltro de grafito se sumergió en esta solución por 10 minutos seguido de un secado al aire. El proceso de sumergido “dipping” y secado al aire se repite tres veces para aumentar la carga de GO en la superficie del CF. Posteriormente el GO sobre el fieltro de grafito fue reducido electroquímicamente aplicando un voltaje de -1.3 V contra en el electrodo de referencia con un arreglo de tres electrodos en una solución de 0.5M Na_2SO_4 por 1200 segundos. Luego se realizaron lavados con agua desionizada y secado al aire a 60°C por 4 horas (C. Zhang et al., 2016).

Polimerización del rojo neutro (*PNR*)

Previo a la polimerización se llevó a cabo una activación del electrodo realizando una voltamperometría cíclica con un barrido entre -0.5 V y 1.5V vs Ag/AgCl a 50mV/s en una solución 1 M de H_2SO_4 hasta que se obtiene una gráfica estable.

La polimerización del rojo neutro se obtuvo con el siguiente procedimiento donde el electrodo se sumergió en una solución 1mM del monómero (Rojo neutro) en buffer de fosfatos 0,025M y 0.1M de KNO_3 en un arreglo de 3 electrodos, disposición que se puede observar en el Anexo 6. El electrodo se conectó con el potenciostato mediante un alambre de Pt y dos postes de Pd (proporcionados por el laboratorio de Química del Dr. Solorza). La polimerización se llevó a cabo a pH6 y 25°C . Para la polimerización se realiza una voltamperometría cíclica (Mardiana et al., 2015). El potencial aplicado durante la voltamperometría se barre entre -1.5 a +1V durante 90 ciclos.

6.5. Actividad 5.

6.5.1. Propósito

El propósito de esta actividad será evaluar el efecto de la implementación de

nanotecnología en el cátodo en las configuraciones de 2 y 3 cámaras de una *CESIM* sobre la producción, concentración y purificación del *H₂Succ*.

6.5.2. Diseño experimental

Consistió en un diseño experimental tabla 6 completamente al azar. Donde el factor del diseño es el número de cámaras en la celda de electrosíntesis (2 o 3 cámaras) que incluye dos tipos de membranas de intercambio aniónico.

Tabla 6 Diseño experimental de *CESIMs*

Factor: Numero de cámaras

3 cámaras

2 cámaras

Las variables de respuesta serán

- *H₂Succ* y concomitantes
- Biomasa suspendida
- Biomasa adherida al cátodo
- Azúcares reductores

Controles

El control para el diseño experimental consiste en una fermentación convencional en frascos serológicos.

A continuación, tabla 6, se muestra los tratamientos que se llevaron a cabo durante este experimento.

Tabla 7. Tratamientos experimentales para evaluar el número de cámaras en la producción de ácido succínico a partir de hidrolizado de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos

Número de Tratamiento	Notación	Número de cámaras	Tipo de cátodo	Tipo de membrana de separación	Tipo de reactor/Volumen de trabajo
T1	2c	2	Cátodo de tela de carbono	Nafion	CESIM/1.8
T2	3; c	3	Tela de carbono	Nafión/Zirfon	CESIM/1.8
T3	3; c	3	Tela de carbono	Nafión/Fumasep	CESIM/1.8
T4	fc	0	NA	NA	Frascos serológicos/0.5

La construcción de la celda se realizó como lo mencionado en el punto 6.3.2.

6.5.3. Programa de supervisión y análisis

Se tomó muestra de cada cámara para su análisis según el punto 6.3.3.

6.5.4. Técnicas y procedimientos

Los índices se utilizaron para evaluar el rendimiento de la celda y Evaluación de efecto de la tercera cámara en la purificación y concentración.

Índices para evaluar el rendimiento de la celda

El rendimiento se calculó de acuerdo a la Ecuación 1

$$Y = m_{H2Succ,gen}/m_{US} \quad [1]$$

donde $m_{H2Succ,gen}$ es la masa de $H2Succ$ 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 Ecuación 2

$$Y' = m_{H2Succ,gen}/m_{IS} \quad [2]$$

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

Por antecedentes del grupo de trabajo se sabe que los requerimientos energéticos

de calefacción y energía de mezclado son los que contribuyen en la mayor parte de la energía que se ocupa en el sistema. Sin embargo, estos requerimientos energéticos son los mismos para todos nuestros ensayos ya que se dieron en las mismas condiciones del ensayo. La energía eléctrica consumida es la única que difiere entre tratamientos, por lo cual se eliminan la energía de calefacción y mezclado del análisis, considerándolos iguales para los ensayos.

Se calculó el índice de uso energético según la Ecuación 3

$$\varepsilon = \frac{\text{masa final de } H_2\text{succ (producido)}}{\text{energía eléctrica consumida}} \quad [3]$$

La energía eléctrica se calculó de acuerdo a la Ecuación 4

$$E_{\text{electr}} = \int P \cdot dt = \int E_{\text{aplicada}} * I \cdot dt \quad [4]$$

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.

El índice ω , señala la relación entre el *H2Succ* producido y los compuestos concomitantes, donde una ω alta 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* (Ecuación 5)

$$\omega = \frac{m_{H_2\text{succ}}}{m_{\text{ácido acético}} + m_{\text{ácido fórmico}}} \quad [5]$$

Evaluación de efecto de la tercera cámara en la purificación y concentración

Esta se evaluará mediante el cálculo de la eficiencia de extracción del producto (*H2Succ*) que se definirá como la proporción entre m extraída y m producida en relación a la superficie de membrana

Eficiencia de extracción según la Ecuación 6

$$Ef_{ext} = \frac{m_{H_2Succ\ extraída}}{m_{H_2Succ\ producida}} \times (100) \quad [6]$$

Donde Ef_{ext} es la eficiencia de extracción, $m_{H_2Succ\ producida}$ es la masa de producto producida en la *CESIM* y $m_{H_2Succ\ extraída}$ es la masa de producto existente en la cámara intermedia; basado y modificado de la tasa de extracción de (Gildemyn et al., 2015).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Procuración de materiales y construcción de equipo

Se muestra la elaboración de electrodos de referencia de Ag/AgCl en la figura 3. con los que se estableció el potencial por administrar, se midió en potencial de la media celda y también como electrodo de referencia para las metodologías de modificación de los electrodos. Los electrodos de referencia elaborados tienen una diferencia de 12mV con respecto a un electrodo de referencia de Ag/AgCl comercial, medido con un multímetro digital. Los electrodos se podían utilizar satisfactoriamente dentro de la celda sin presentar fugas y manteniendo la hermeticidad de la *CESIM*.



Figura. 3. Modificaciones a la celda y electrodos para ser utilizados en la *CESIM*. De izquierda a derecha se observa el conector utilizado y modificado, Los orificios adicionales elaborados con el conector y a la derecha el conector unido con el electrodo de referencia

Los resultados de esta sección de las placas de acrílico, los empaques de silicón, las placas de acero inoxidable y los puertos de muestreo se pueden observar en la figura 4.

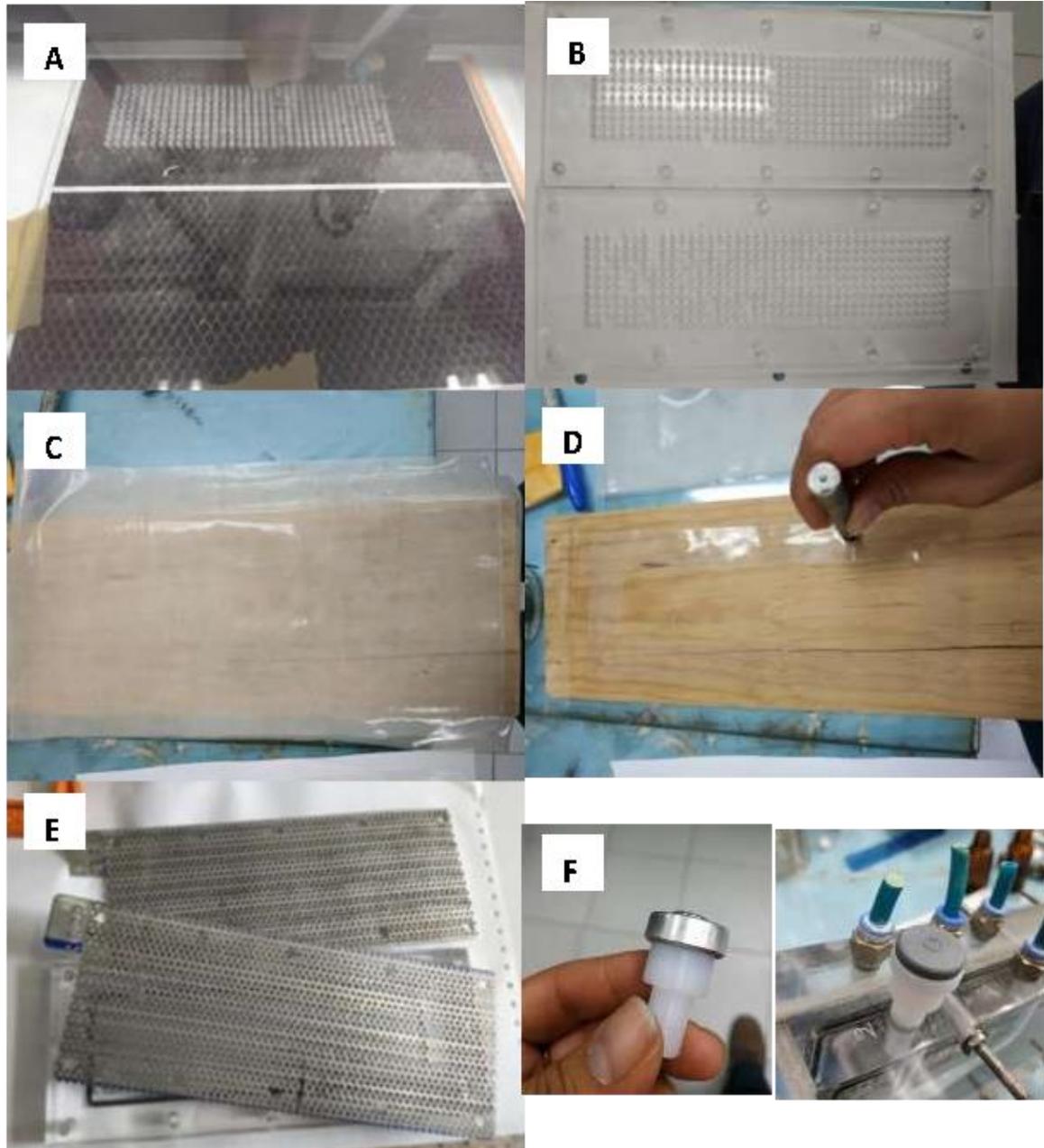


Figura. 4. Modificaciones al diseño de la CESIM

Se puede observar en la figura 4. En las figuras A y B que se hicieron unas placas de acrílico de 0.4 cm. Las figuras B y D muestran el empaque utilizado para sellar las nuevas modificaciones. La figura E muestra los marcos para el electrodo de acero inoxidable. Las dos figuras F de observa un puerto de muestreo.

En las figuras 4 A y 4B que se hicieron unas placas de acrílico de 0.4 cm perforadas para que ejercieran una barrera que impidiera la deformación de las membranas en el interior de la celda pero que si permitieran el funcionamiento de la misma, ya que la membrana Nafion específicamente tiene una expansión linear de aproximadamente del 10% (specification information, Fuel Cell Store) lo que puede provocar que el interior de la celda la membrana se deforme y los volúmenes internos no sea equivalentes. Los puertos de muestreo funcionan como el cuello de un frasco serológico lo que nos permite sellar la celda, gasearla con CO₂ y tomar muestra de manera fácil y sin fugas.

7.2. Preservación, propagación de cepa e inóculos

Se preparó hidrolizado de FORSU y se destoxificó con carbón activado en cantidad suficiente para llevar a cabo todo el trabajo proyectado con un mismo lote. Los resultados de la caracterización del hidrolizado de FORSU se muestran en la tabla 7 que corresponden a sus propiedades antes y después de la destoxificación.

Tabla 8 Caracterización de la Fracción Orgánica de Residuos Sólidos urbanos

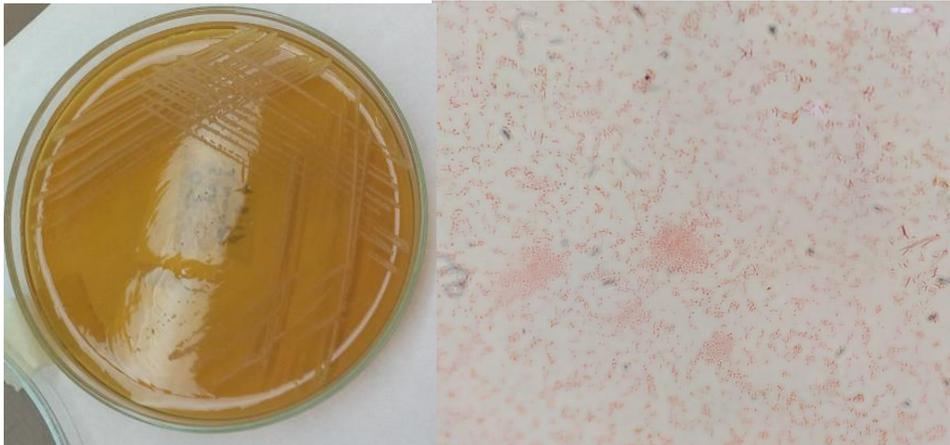
Parámetro	FORSU hidrolizado	FORSU Destoxificado
pH	0.5	1
Azúcares reductores (g L ⁻¹)	25.9	20.8
Contenido de fenoles totales (g L ⁻¹ de ácido gálico equivalentes)	0.51	0.05
Contenido de fenoles totales (g L ⁻¹ de ácido siríngico equivalentes)	1.02	0.11

Se observa como los valores de azúcares reductores están dentro del rango obtenido en el grupo de trabajo que concuerda con Hernández-Correa (2018). Además, el contenido de inhibidores después de la destoxificación disminuye hasta un 10% del contenido inicial lo que demuestra que la destoxificación con carbón activado es eficiente. Esta destoxificación permite que como en trabajos anteriores del grupo de trabajo este residuo pueda ser utilizado como sustrato alternativo para el crecimiento de microorganismos de interés.

Se pidió la cepa a la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos

Celulares (CDBB) la cual se reactivó en medio Agar Trypticaseína Soya en tubo inclinado y en placa. La cepa tarda en crecer aproximadamente 48 horas. Con la cepa reactivada se procedió a crecerla en medio líquido Caldo Trypticaseína Soya y medio hidrolizado de FORSU anaeróbico. Se observa en la figura 5. el crecimiento de *A. succinogenes* proveniente de la CDBB en placa la cual se observa como colonias blancas traslúcidas de tamaño promedio de 1mm de diámetro. Por su parte en la tinción de Gram se observan células en forma de barra o cocobacilo gram negativas, esto concuerda con la descripción celular y colonial en la descripción de esta especie (Guettler, Rumler, & Jainf, 1999a)

Figura. 5 Cepa *Actinobacillus succinogenes* crecida en placa de Trypticaseína



soya y tinción de Gram 1000X

7.3. Ensayos de *CESIM* de 3 cámaras

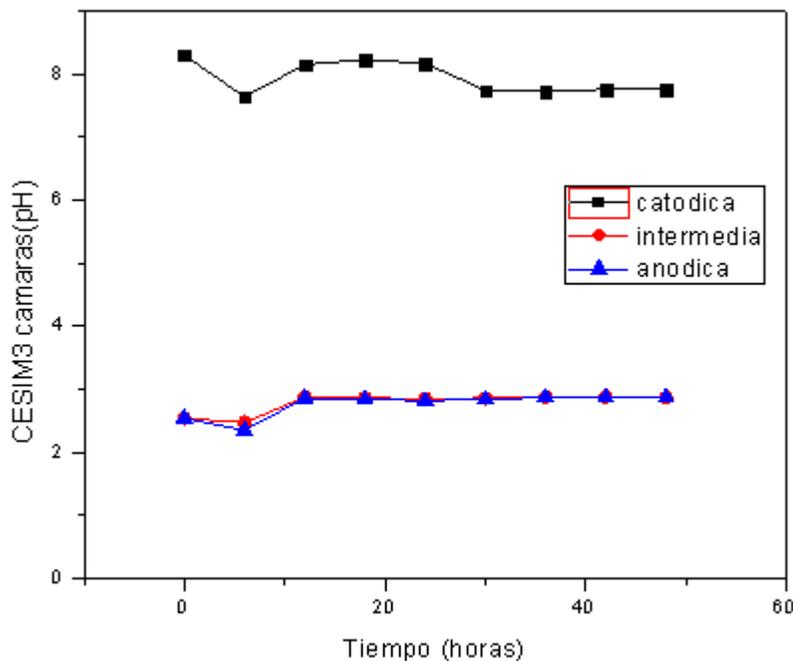
Para los ensayos de *CESIM3* se utilizó dos tipos de membranas de intercambio aniónico la membrana Zirfon® y la membrana Fumasep® FAA-3-PK-130.

Los resultados de la celda con membrana Zirfon se muestran en la tabla 8 y figura 6 que muestran la cantidad de producto que se encuentra en cada celda después de 18 horas.

Tabla 9 Contenido en las diferentes cámaras de los ácidos

	ÁC. SUCCÍNICO	ÁC. FÓRMICO	ÁC. ACÉTICO
C. Catódica 0 horas	7.2330	2.72522074	4.0613094
C. Catódica 18 horas	7.6679	3.57723926	4.0873459
C. Intermedia 0 horas	0	0	0
C. intermedia18 horas	0	0	0

Como se observa en la tabla no existe transferencia de los ácidos de interés hacia la cámara intermedia del arreglo con membrana Zirfon, no existe comunicación entre las cámaras como también se puede observar en la figura 6 de seguimiento de pH en la cual se mantiene constante los valores de pH desde sus valores iniciales para cada una de las cámaras. A diferencia de lo que se puede observar en la *CESIM* de 2 cámaras o en la *CESIM* de 3 cámaras con membrana Fumasep.

**Figura. 6** Seguimiento de pH en la *CESIM* con membrana Zirfon.

La membrana Zirfon es un polímero polisulfonado con un relleno de óxido de circonio embebido en el polímero (Aerts et al., 2006; Kuypers, Genné, & Leysen, 1995)

que forma una membrana porosa que difiere en tamaño de poro según la carga de óxido de circonio que tenga la membrana comercial no ofrece una descripción del tamaño de poro de la misma.

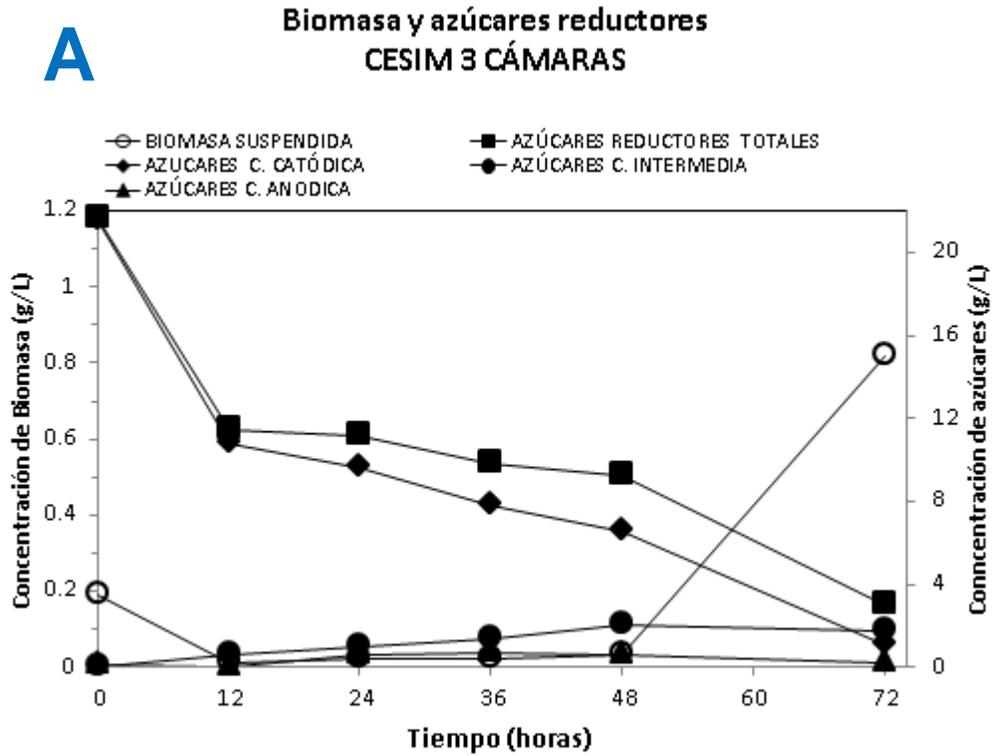
El potencial aplicado a cada celda fue medido con un multímetro y se estableció de ánodo a cátodo, manteniendo para ambas celdas un potencial promedio de -1.8V. Se calculó la corriente que pasaba por el sistema con ayuda de una resistencia utilizando la ley de ohm teniendo como resultado que la celda de dos cámaras en promedio atravesaba 0.006A a través de toda el área proyectada 100cm², mientras que para la *CESIM* de 3 cámaras el promedio fue de 0A, es decir que no existía flujo de electrones dentro de la celda. Esto dilucida que no existe comunicación entre las cámaras de la celda armada con membrana Zirfon, por lo cual cada cámara funcionaría como sistemas cerrados el uno del otro.

Este comportamiento se podría explicar debido a que los poros de la membrana pudieron haberse tapado con el contenido de MgCO₃ de la solución de la cámara catódica, y al bloquearse impidió es transporte de cualquier compuesto entre las cámaras de la *CESIM*.

La membrana utilizada fue una membrana de intercambio aniónico Zirfon que por sus problemas de transferencia se reemplazó con una membrana de Fumasep. Previo a los ensayos se probó la nueva membrana de intercambio aniónico de la marca FumaTech, membrana Fumasep FAA-3-PK-130, para comprobar que funcionara como separador del producto de interés y su comportamiento en condiciones de fermentación. Para esta prueba se montó una celda de tres cámaras con todos los componentes, pero sin inóculo y además se adicionaron los productos de fermentación esperados, a partir de reactivos del laboratorio, tras una fermentación para ver su dinámica en el sistema con la nueva membrana, donde se comprobó que existe transferencia de los compuestos a la cámara intermedia pero también de los azúcares del sustrato.

En los ensayos de la *CESIM* de 3 cámaras, se hicieron tres ensayos, la *CESIM* de 2 cámaras, la *CESIM* de 3 cámaras y un control que fue una fermentación convencional que se llevó a cabo en viales; todos los ensayos se llevaron a cabo en condiciones anaerobias. Se muestran en la figura 7A, 7B y 7C la cinética de azúcares

presentes, determinados por la técnica de azúcares reductores DNS, en las diferentes cámaras durante el tiempo de fermentación además de la biomasa suspendida presente en la cámara catódica. No se detectó biomasa suspendida por densidad óptica en las cámaras catódicas o la cámara intermedia.



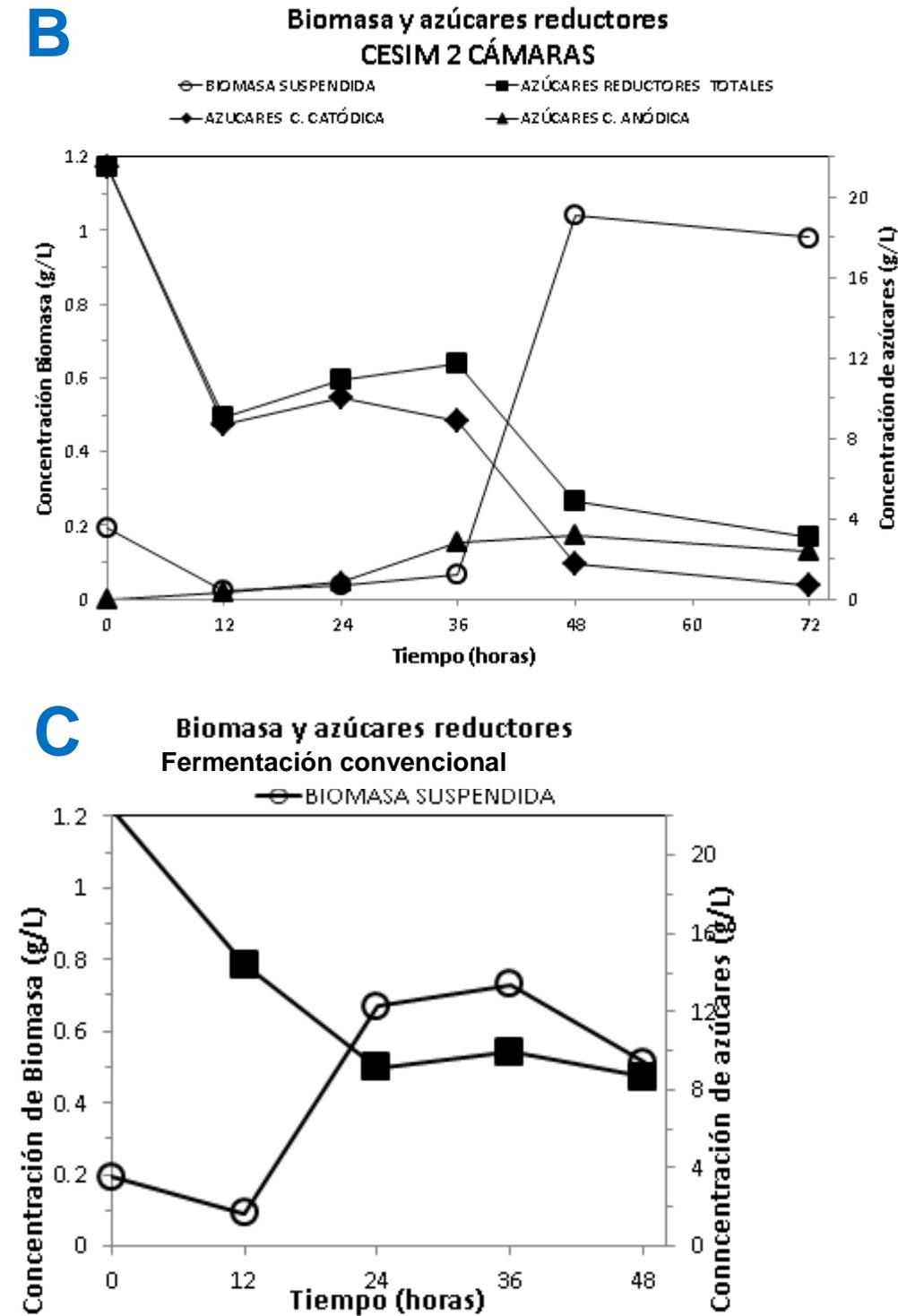


Figura. 7 Gráficas de azúcares reductores en las diferentes cámaras y biomasa para la *CESIM3* (A), LA *CESIM2* (B) y la fermentación convencional (C).

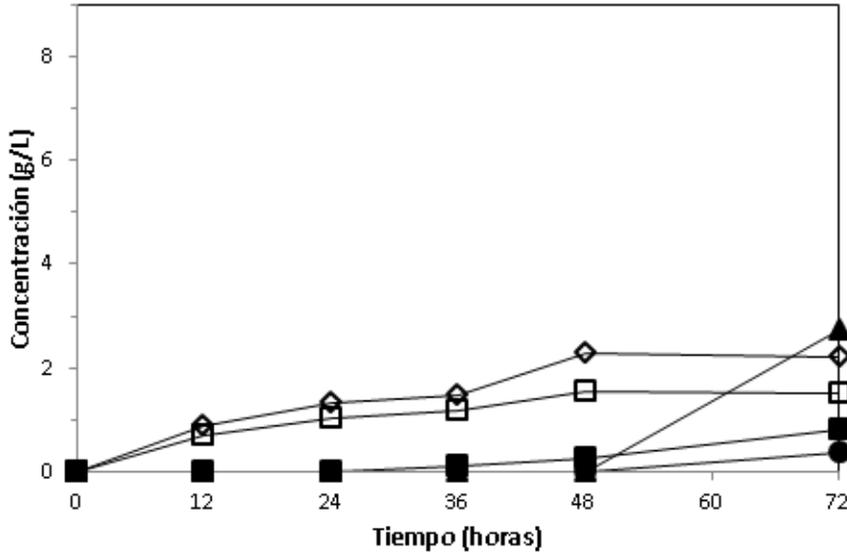
Se puede observar que la presencia de biomasa está relacionada con el consumo

de azúcares. La biomasa en la celda tiene una posible fase de aclimatación más prolongada que en la fermentación convencional que hasta después de las 36 horas se muestra un incremento en la misma, también la diferencia entre la biomasa inoculada al tiempo 0 y la biomasa presente entre los diferentes muestreos, puede diferir ya que la biomasa inicial se calculó según lo que se colocó en la celda. La biomasa en la fermentación convencional no llega a las concentraciones mayores que se pueden observar en las celdas y para las 48 horas entran en una fase de decaimiento. Además, se consumen mayor cantidad de azúcares totales en las celdas que en el control sin electricidad.

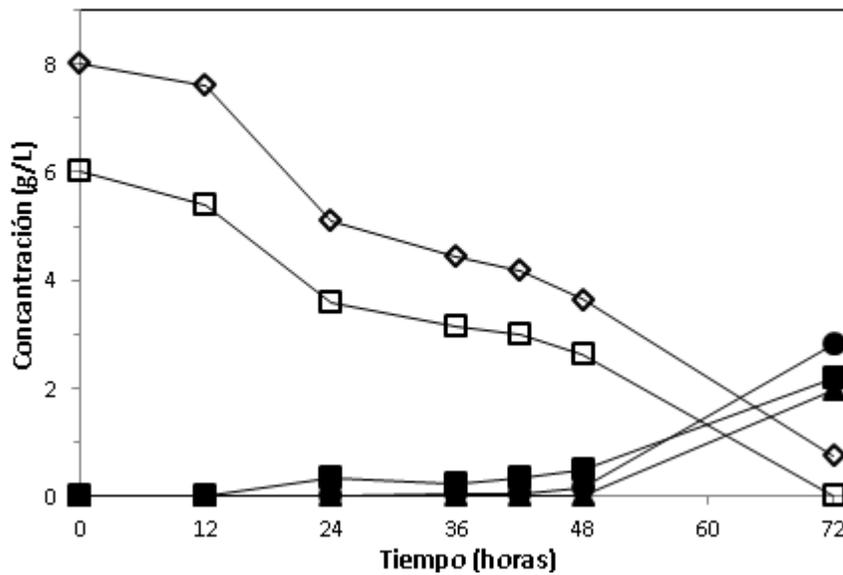
En las siguientes figuras se muestran los productos de fermentación y los azúcares principales del medio, determinados por HPLC, en los diferentes ensayos y en las diferentes cámaras que tiene cada sistema. Para la *CESIM3* se observa en la figura 8.

A**Cámara intermedia CESIM3 cámaras**

□ glucosa ◇ xilosa ● H₂succ ▲ Fórmico ■ Acético

**B****Cámara catódica CESIM 3 cámaras**

□ glucosa ◇ xilosa ● H₂succ ▲ Fórmico ■ Acético



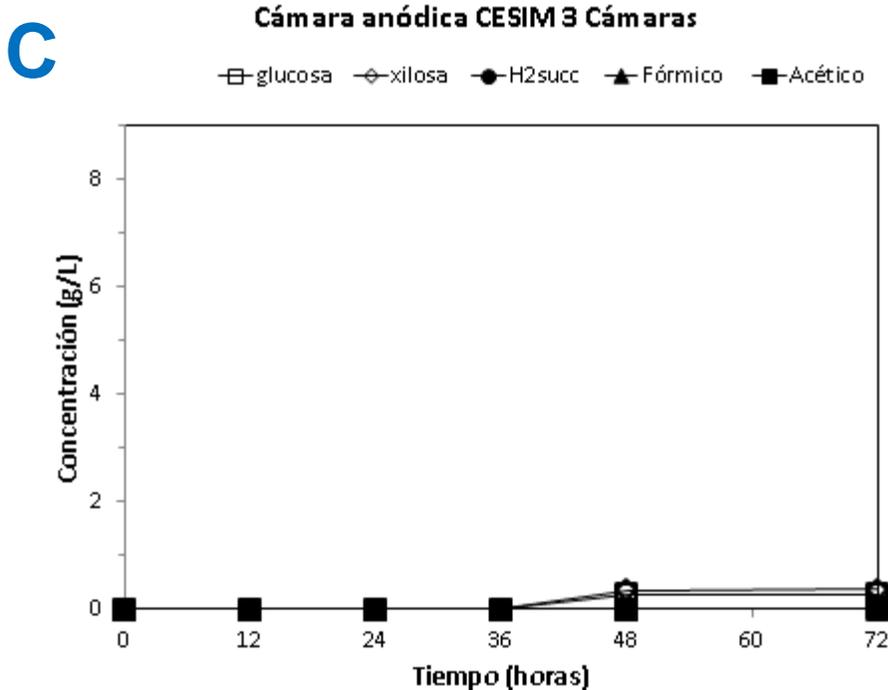


Figura. 8 Cinética de los principales azúcares y productos de fermentación en la *CESIM3*, en las diferentes cámaras A Cámara intermedia, B cámara catódica, C cámara anódica.

Se puede observar que en la cámara intermedia si existe transferencia de los productos de fermentación a la misma, a diferencia de la *CESIM* con membrana Zirfon. Sin embargo, también existe transferencia de los azúcares del sustrato. Lo cual indica que no fue suficientemente selectiva la membrana para dejar pasar solo el producto de interés. Correspondiente a los productos de fermentación transferidos a esta cámara se observa de mayor a menor concentración ácido fórmico > ácido acético y ácido succínico. Esto se podría explicar por el tamaño de partícula donde el ácido fórmico es de menor tamaño y por eso podría verse favorecido. Por otra parte, a velocidad de transporte de iones a través de las membranas de intercambio iónico está determinada tanto por la concentración del ion (intercambio iónico) y su movilidad en las membranas. El intercambio iónico está relacionado con la valencia y el tamaño de los iones (Luo et al., 2018). Esto también puede explicar esta diferencia en la transferencia. Cabe resaltar que en la cinética de la fermentación convencional el primer producto en formarse es el ác. Fórmico lo que explicaría su mayor presencia en la cámara intermedia ya que tiene oportunidad de transferirse por mayor tiempo.

Por su parte como se observa en la Figura 8B tiene un perfil similar al perfil de una

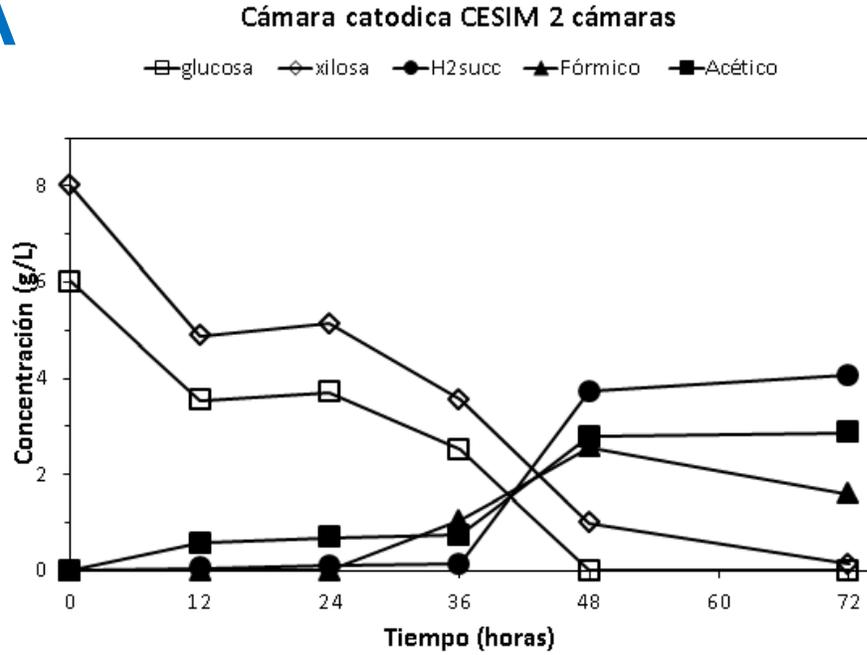
fermentación convencional favorecida Figura 10 para el *H₂Succ* que podría no estar transfiriéndose por su aparición tardía en el proceso de fermentación. Por su parte en la figura 8C se observa que existe una mínima transferencia de los productos de fermentación y los azúcares.

En la *CESIM2* Figura 9 se observa como existe una mayor transferencia de los azúcares a la cámara anódica, especialmente interesante es que al final de la fermentación existe un consumo de esos azúcares. Al ser el separador una membrana de intercambio catiónico no se esperaría transferencia de los compuestos producto de la fermentación, sin embargo, existe una movilización de los mismos, siendo en este caso favorecido el ácido acético>Fórmico> y *H₂Succ* finalmente.

Se desglosó la generación de productos y el consumo de sustrato determinado por HPLC donde se observa que se alcanzan mayores concentraciones de biomasa y una equiparable y hasta mayor presencia de productos en la *CESIM* de 2 cámaras que en la *CESIM* de tres cámaras en términos de concentración g/L en la cámara catódica.

Por su parte la fermentación convencional tiene un consumo de sustrato menor y un tiempo de fermentación más corto ya que empieza a partir de las 12 horas mientras que en las celdas empiezan a partir de las 36 o 48 horas. Esto podría explicarse por un tiempo de aclimatación más largo para las celdas, quizá por la administración de corriente o porque por el diseño, la agitación no es tan eficiente como con los frascos serológicos. Esto debido a que la celda tiene una forma de un prisma rectangular mientras que la fermentación convencional se da en un cilindro.

A



B

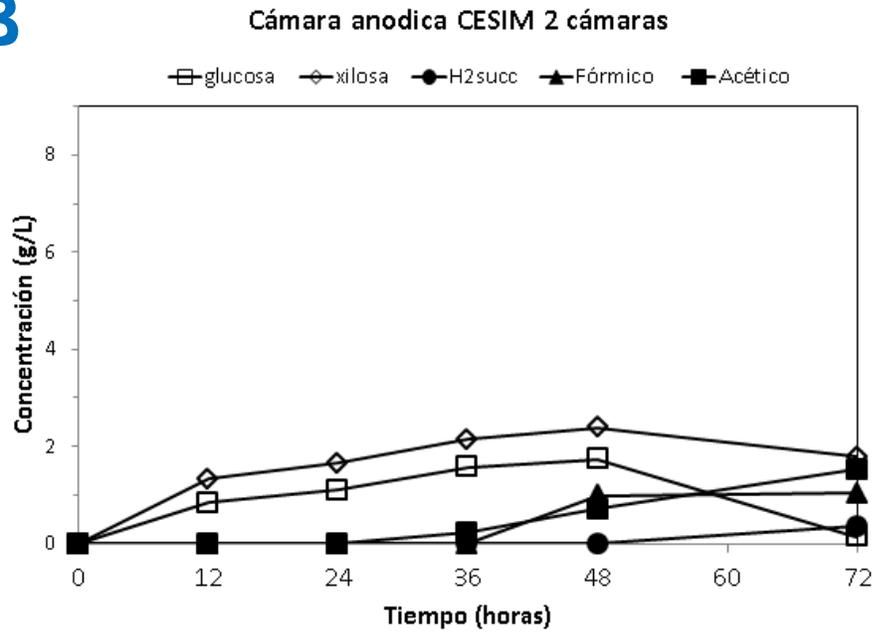


Figura. 9 Cinética de los principales azúcares y productos de fermentación en la CESIM2, en las diferentes cámaras A Cámara catódica, B cámara anódica.

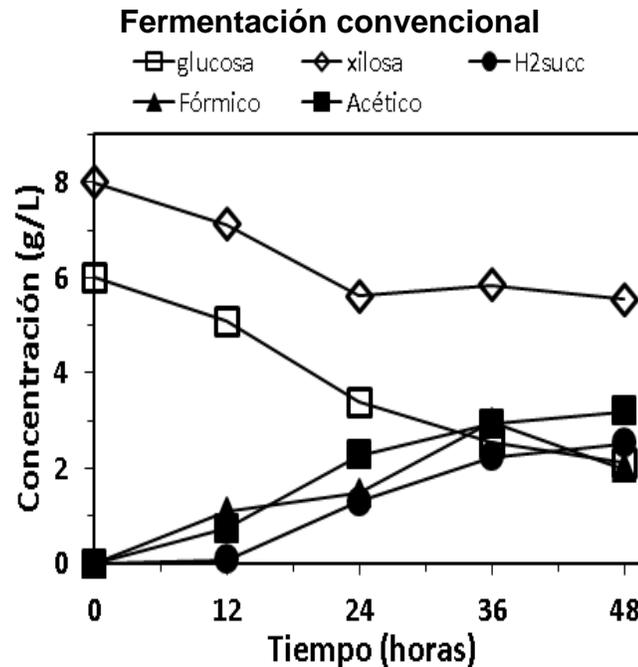
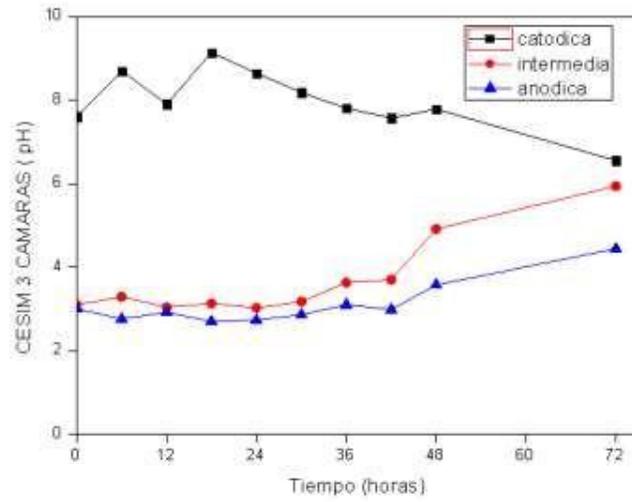


Figura. 10 Cinética de los principales azúcares y productos durante la fermentación convencional.

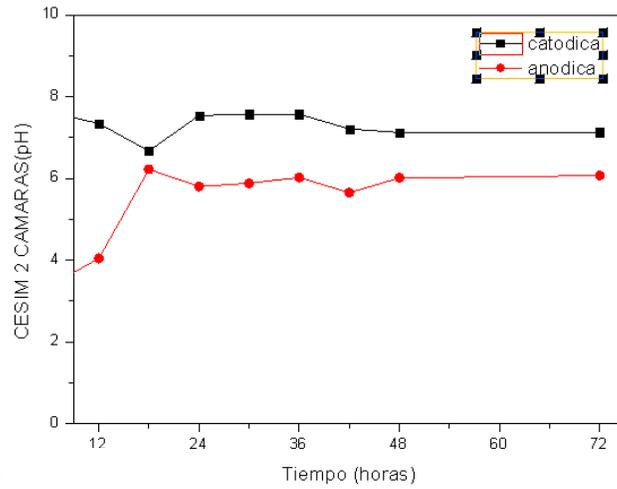
Se considera un posible error experimental en la celda de 3 cámaras que tardo hasta las 72 horas para lograr una fermentación. Si consideramos la separación de los productos en una cámara intermedia se puede observar que a una menor producción de H_2Succ existe la misma transferencia a la cámara intermedia que a la cámara anódica en la *CESIM* de tres cámaras. Además, se observa una menor transferencia de azúcares que en la *CESIM* de dos cámaras.

Se hizo la medición del pH durante la fermentación de los tres sistemas. Se puede observar en la figura11 como en la fermentación convencional el pH se mantiene alrededor de un valor de 7.5. En la *CESIM* de dos cámaras el pH se iguala a las 6 horas, y en la de tres cámaras se mantiene hasta las 48 horas de fermentación donde los valores de pH se elevan en la cámara catódica e intermedia al final de la fermentación, que se puede relacionar con la figura 8 donde la transferencia de productos de fermentación se da de igual manera después de las 48 de fermentación.

A



B



C

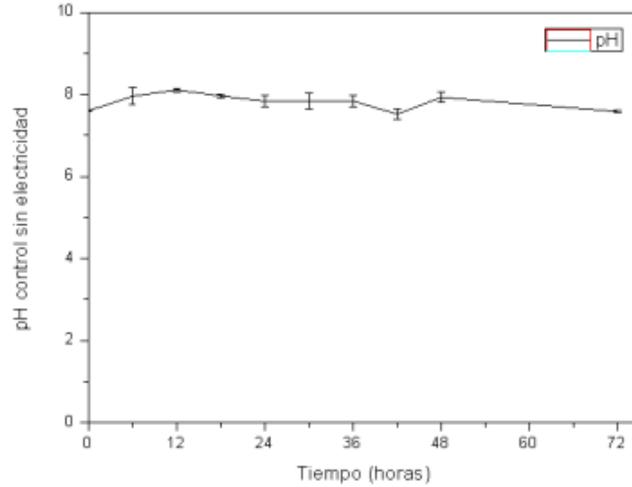


Figura. 11 Cinética de pH durante el tiempo de fermentación de la *CESIM3* membrana Fumasep

Adicional se midió la conductividad de los anolitos, catolitos y la solución de la cámara intermedia a fin de explicar el comportamiento de la celda entendiendo estos parámetros se puede observar en la tabla 9 los diferentes valores de conductividad para las soluciones.

Tabla 10. Valores de conductividad de las soluciones en las diferentes cámaras

	CÁMARA CATÓDICA	CÁMARA INTERMEDIA	CÁMARA ANÓDICA
Conductividad (mS/cm)	59.3	19.4	37.021

El potencial aplicado a cada celda fue medido con un multímetro y se estableció de ánodo a cátodo, manteniendo para ambas celdas un potencial promedio de - 1.8V. Se calculó la corriente que pasaba por el sistema con ayuda de una resistencia y la ley de ohm.

Los resultados del seguimiento de voltaje y corriente del sistema se muestran en las figuras 12 y 13, para *CESIM 3* y *CESIM2* respectivamente. Haciendo el cálculo y la integración de la potencia durante toda la fermentación; y se calculó la energía suministrada a cada celda, donde para la *CESIM 3* es de Energía de 1.36 kJ y para la *CESIM 2* es 1.59 kJ.

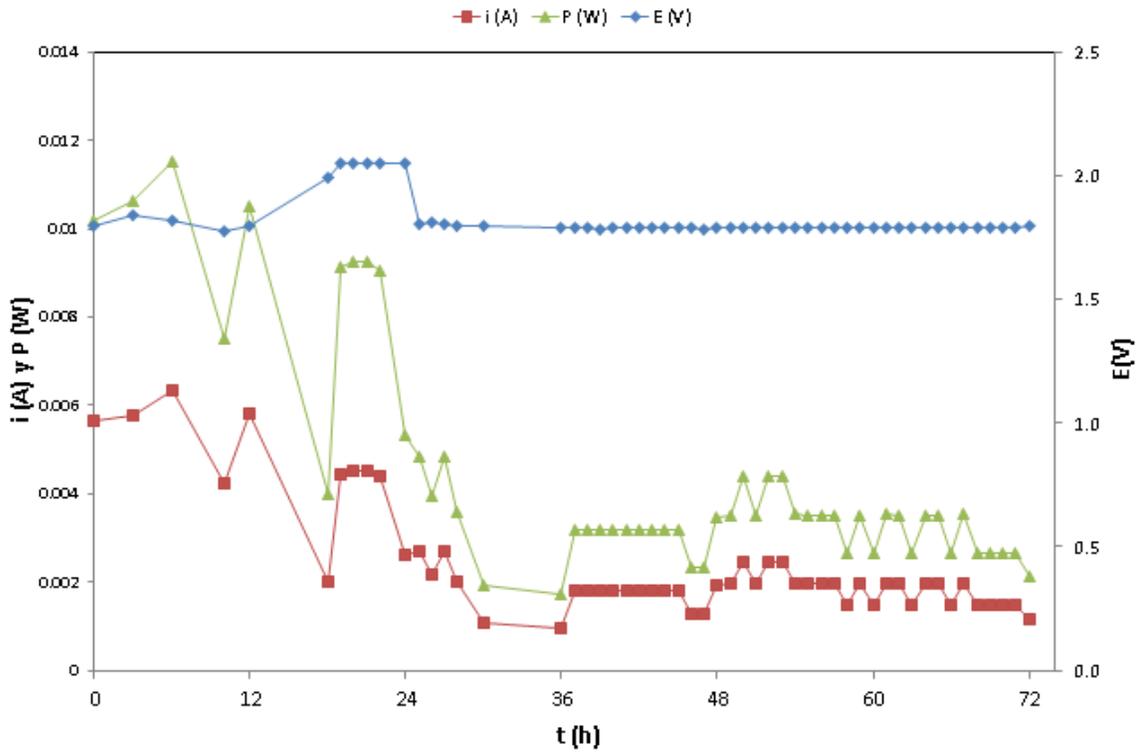


Figura. 12 Seguimiento de voltaje, corriente y cálculo de Potencia de CESIM de 3 cámaras

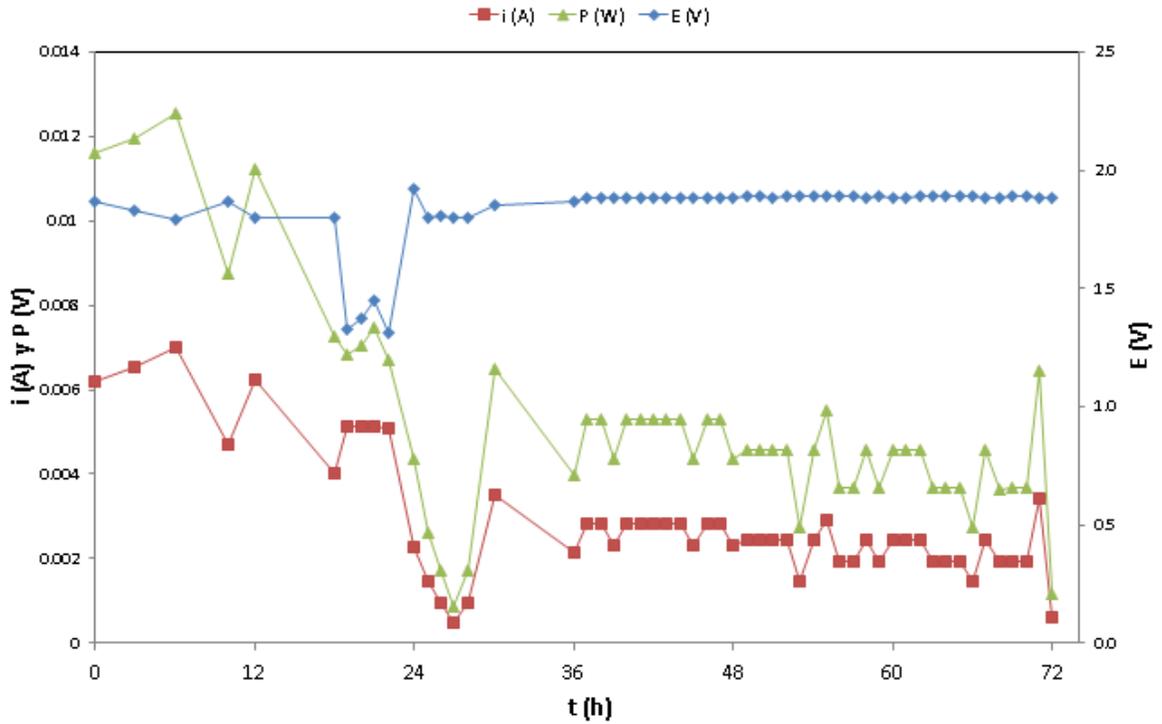


Figura. 13 Seguimiento de voltaje, corriente y cálculo de Potencia de CESIM de 3 cámaras

7.4. Implementar nanotecnología en el cátodo de *CESIM*

7.4.1. Óxido de grafeno reducido

La síntesis de GO partió de 3.0017g de polvo de grafito sintético <math><20\ \mu\text{m}</math> y se obtuvieron al final de la reacción 5.0929g de óxidos de grafeno, esto indica que este grafito pudo oxidarse y al agregarse grupos O en las capas del grafito se aumenta su masa. El GO obtenido se liofilizó y se pulverizó para los siguientes experimentos. El proceso de síntesis de GO se representa con imágenes en el Anexo 5.

Se analizó el grafito en un equipo de Difracción de rayos X (XRD) con una fuente de cobre de $1.54\ \text{\AA}$ con un barrido de 5 a 60° $2\ \theta$ con un paso de 0.02° a 0.2 seg. Los resultados del XRD se muestran en la figura 14. Donde se observa en negro el patrón de difracción de grafito con su pico mayor característico a 26° , y los otros picos característicos a 42° , 44° y 56° que coinciden con la carta cristalográfica para grafito 96-120-0018. Por su parte el GO tiene un pico en a 10° que simboliza la oxidación del grafeno y una desaparición de su pico a 26° . Este difractograma nos confirma la oxidación del grafito que coincide con lo reportado en otros trabajos como (Aliyev et al., 2019; Shahriary & Athawale, 2014).

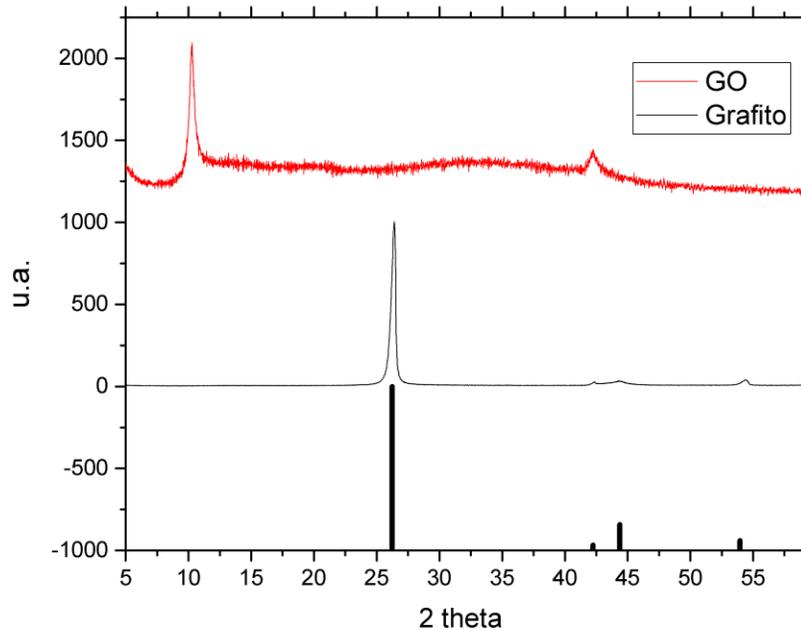


Figura. 14 Difractograma del grafito y el óxido de grafeno, en la parte inferior los picos correspondientes a la Carta cristalográfica 96-120-0018

La caracterización por microscopía el grafito y el óxido de grafeno se muestra en las figuras 15. Donde se observa el grafito laminar menor a 20 micras (SIGMA) en la figura 1a y 1b. Por su parte se puede observar en las figuras 2a, b y c el óxido de grafeno. En las figuras 2b se observa que tienen una mayor distancia entre las capas que lo conforman, además de que son más finas en comparación con las del grafito 1b. La 1b se observan líneas rectas de hojas rectas mientras que en la 2b se observan láminas finas y curvadas. Se observa principalmente en la figura 2C como se ven por encima unas finas hojas que caracteriza las láminas de GO que se caracterizan por la apariencia arrugada cubriendo el resto de la muestra.

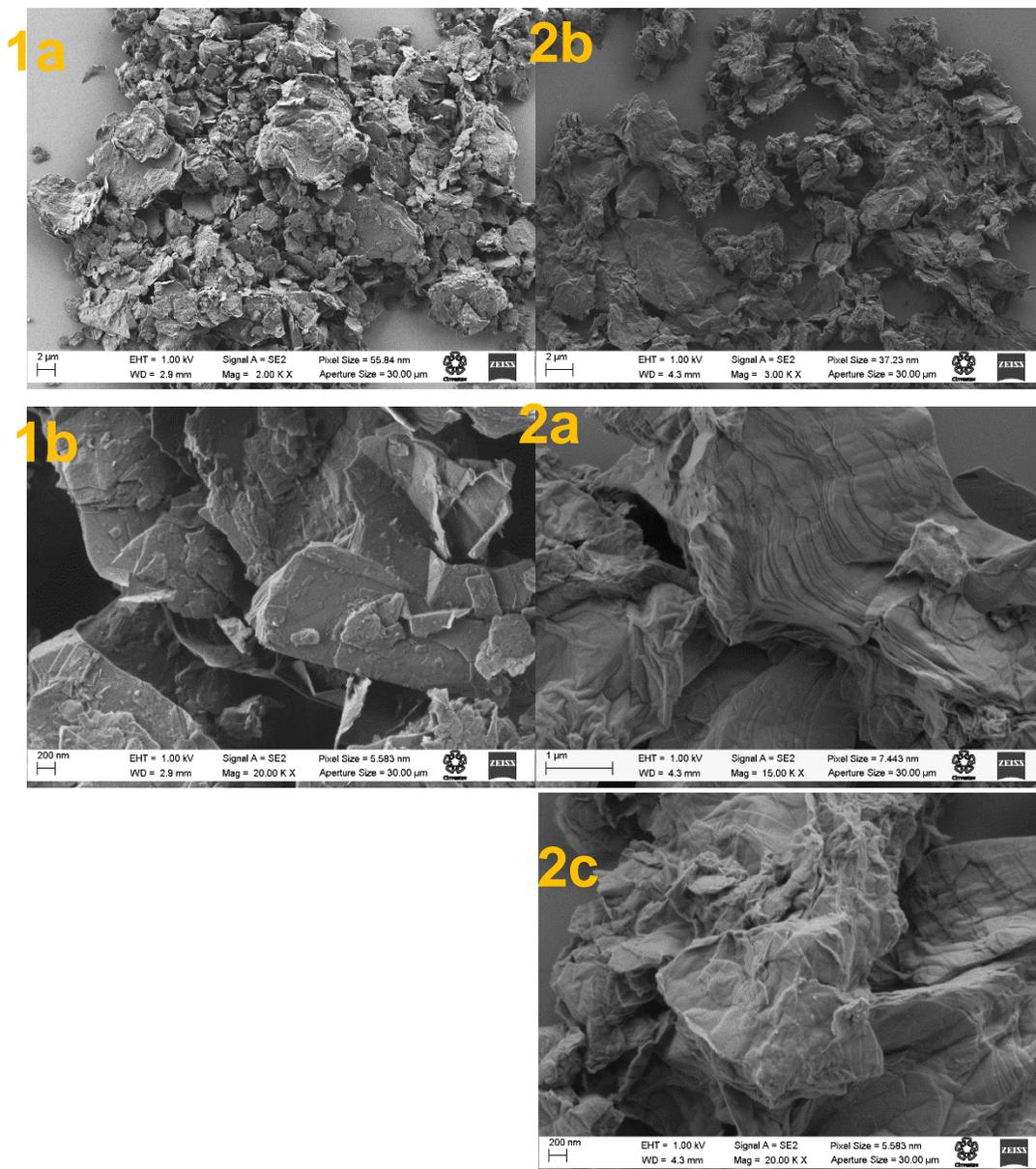


Figura. 15 Micrografías SEM del grafito 1 y óxido de grafeno 2

El óxido de grafeno se redujo electroquímica por el método de Electrodo sumergidos y secados (DIPPING) tres veces. A continuación, se muestra la figura de cómo se observan los electrodos sumergidos en la solución de óxido de grafeno Figura 16.



Figura. 16 Se muestran los fragmentos de electrodo sumergido en la solución de GO 1mg/ml.

Posterior al proceso de “dipping” se analizó también por microscopía el fieltro de grafito con GO figura17, el fieltro de grafito después de la reducción electroquímica figura19 y para comparar se analizó el fieltro de grafito limpio. Se puede observar como el fieltro de grafito tiene marcas longitudinales que siguen a lo largo del fieltro y que no se observa nada más sobre el mismo CF1 y CF2 a un aumento de 30kX se observa que el CF tiene unas irregularidades en la superficie, Por su parte las muestras con GO sobre las fibras de fieltro se observan hojas “arrugadas” sobre la superficie del fieltro la cual a un mayor aumento se observan las hojas de GO tienen una apariencia lisa a diferencia de los pequeños poros del fieltro de grafito limpio.

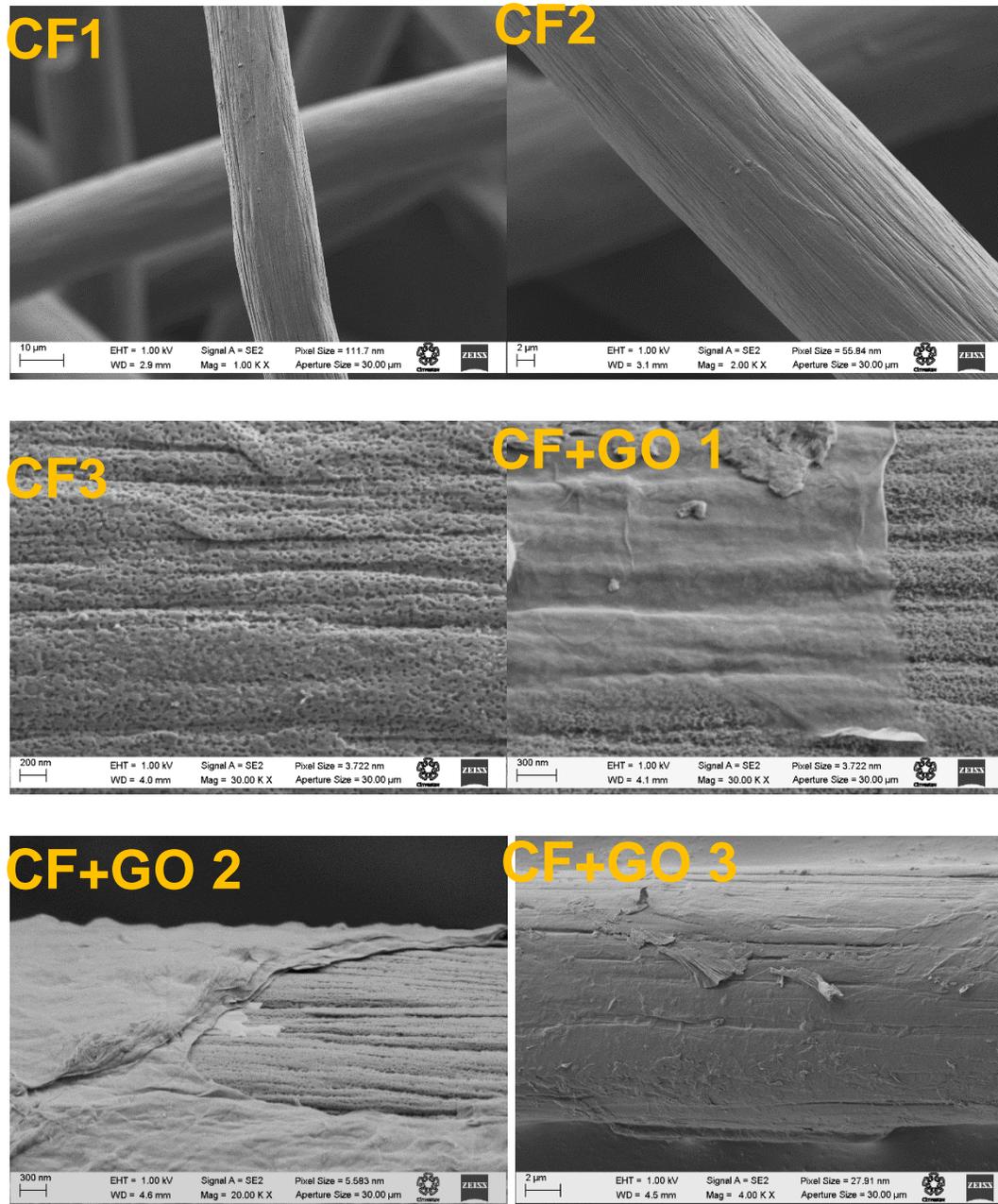


Figura. 17 Filtro de grafito CF y filtro de grafito con GO sobre las fibras (CF+GO)

Para la reducción de estas láminas de GO se hizo una cronoamperometría que se muestra a continuación de las muestras que se sumergieron con la solución de NaSO_4 , donde se había determinado una aplicación de voltajes 90s por cada cm^2 el

cual pasó a ser 2400s por el tamaño de las muestras a reducir Figura 18. Se observa que llegan a una meseta. Los electrones que llegan al electrodo al ser aplicado -1.2V son tomados por el O presente en el GO y así liberado y por lo tanto el óxido de grafeno reducido.

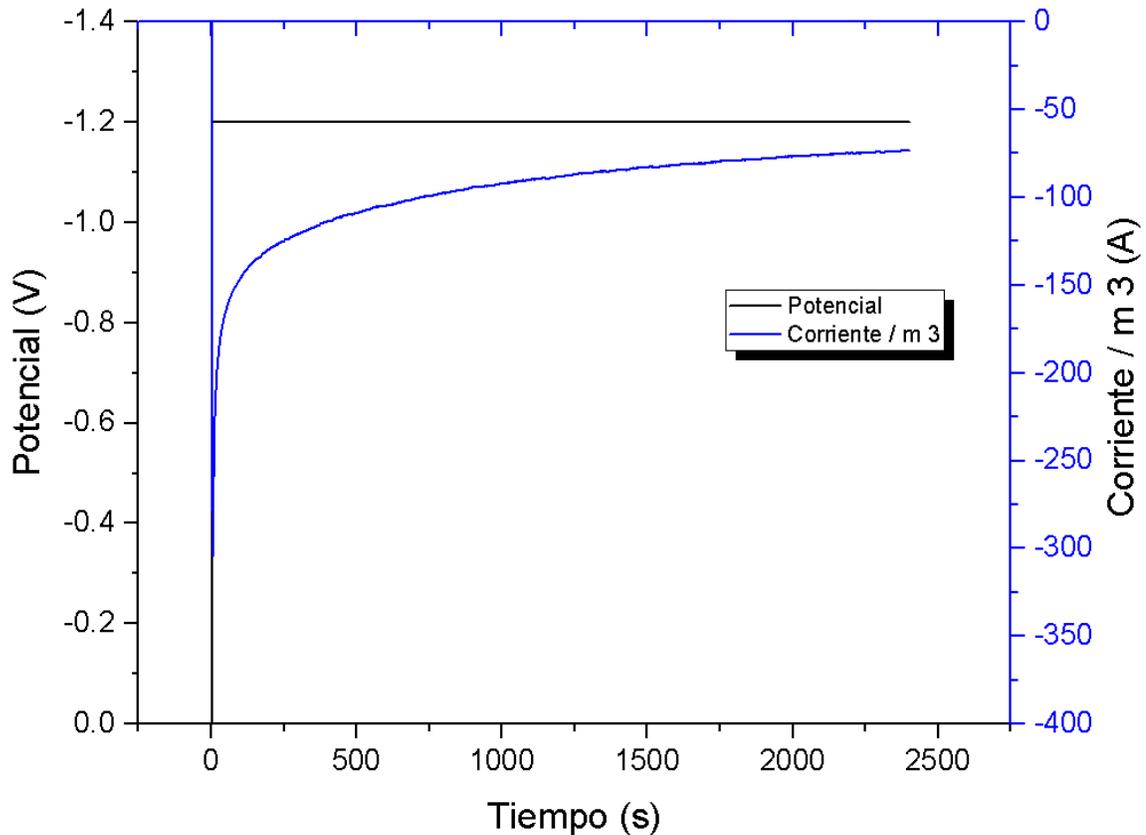


Figura. 18. Cronoamperometría para la reducción electroquímica del GO sobre el CF

La muestra de fieltro con óxido de grafeno reducido se observa de igual forma las láminas arrugadas sobre la superficie del fieltro CF+rGO. Se puede observar como las hojas recubren las fibras del fieltro y en algunas zonas las hojas sobresalen o se acumulan en la periferia de las fibras del fieltro. Se observa la lámina de rGO sobre el fieltro de forma arrugada y que cubre las irregularidades del CF que se observan a 30kX. Las micrografías de la figura 19 contrastan con lo observado en el trabajo en el que se basó la metodología (C. Zhang et al., 2016), donde se observan las hojas de rGO entre las fibras del fieltro, esto podría deberse a que el tamaño del grafito precursor fue mayor dando como resultado hojas de GO y rGO más amplias que

quedaran atrapadas entre las fibras y no recubriendo las fibras como en el caso de las muestras de este trabajo.

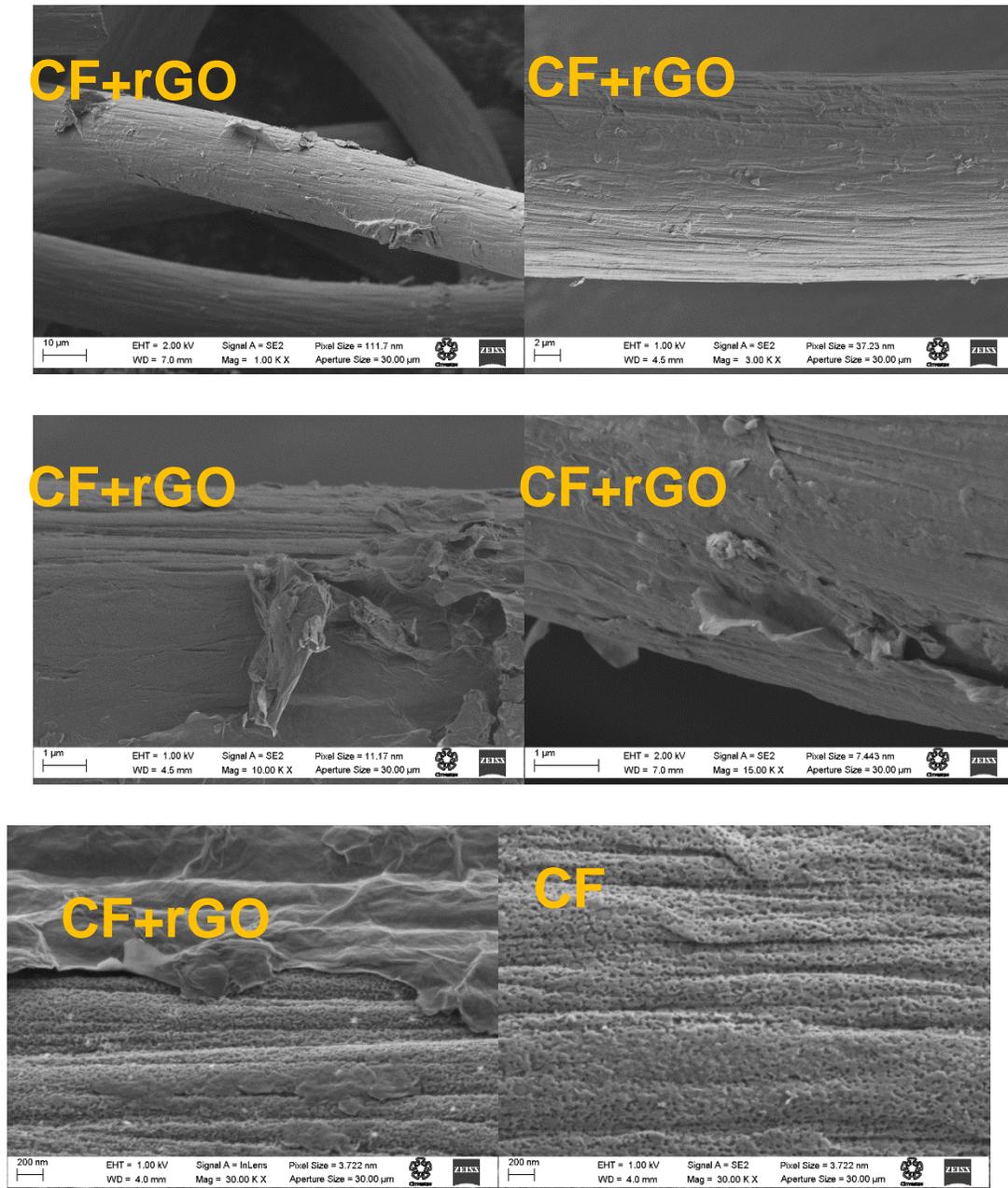


Figura. 19 Micrografías de fieltro de grafito con *rGO* sobre los mismos

Se hizo un análisis de EDS y se calculó la relación atómica O/C del CF, G, GO y *rGO*, donde se desea que la relación sea baja ya que así evidencia la mayor presencia de Carbono que de oxígeno para las muestras de grafito y el fieltro de grafito. Se observa que la relación más alta es la del GO.

En la tabla10 se observa cómo el grafito tiene una relación muy baja, seguido del

fieltro de grafito que es menos puro pero que sigue teniendo una relación baja. Finalmente, el GO sintetizado tiene una relación de 0.398 dentro de lo esperado para la síntesis por este método y con una oxidación aproximada del 30% del grafito.

Tabla 11. Relación atómica O/C de las muestras de grafito, óxido de grafeno y fieltro de grafito

<i>Muestra</i>	<i>Carbono</i>	<i>oxígeno</i>	<i>Relación atómica O/C</i>
G	99.19	0.80	0.008
GO	71.90	28.10	0.398
CF	98.56	1.43	0.014
CF+ GO	79.11	20.89	0.246
CF+rGO	88.52	11.46	0.129

El fieltro de grafito con GO tiene una relación atómica cercana al GO solo, puede disminuir ya que se encuentra sobre el fieltro de grafito, en contraste con el CF+rGO la relación disminuyó, lo que evidenciaría la reducción del GO.

7.4.2. Polimerización de Rojo Neutro

La activación del fieltro y “glassy carbón” se hizo mediante una voltametría cíclica de -0.5V a 1.5V Vs Ag/AgCl hasta que se obtuviera una curva estable. Se observa la activación del material grafítico en la figura 20. Se observa que alrededor de los 10 ciclos de la voltametría se estabiliza. Como de conector se usó platino el cual es inerte en ese rango de voltaje solo se observa la voltamperometría del grafito, con ningún pico sobresaliente de incorporación de otro material sobre el fieltro. Los valores de corriente están normalizados a m² de superficie.

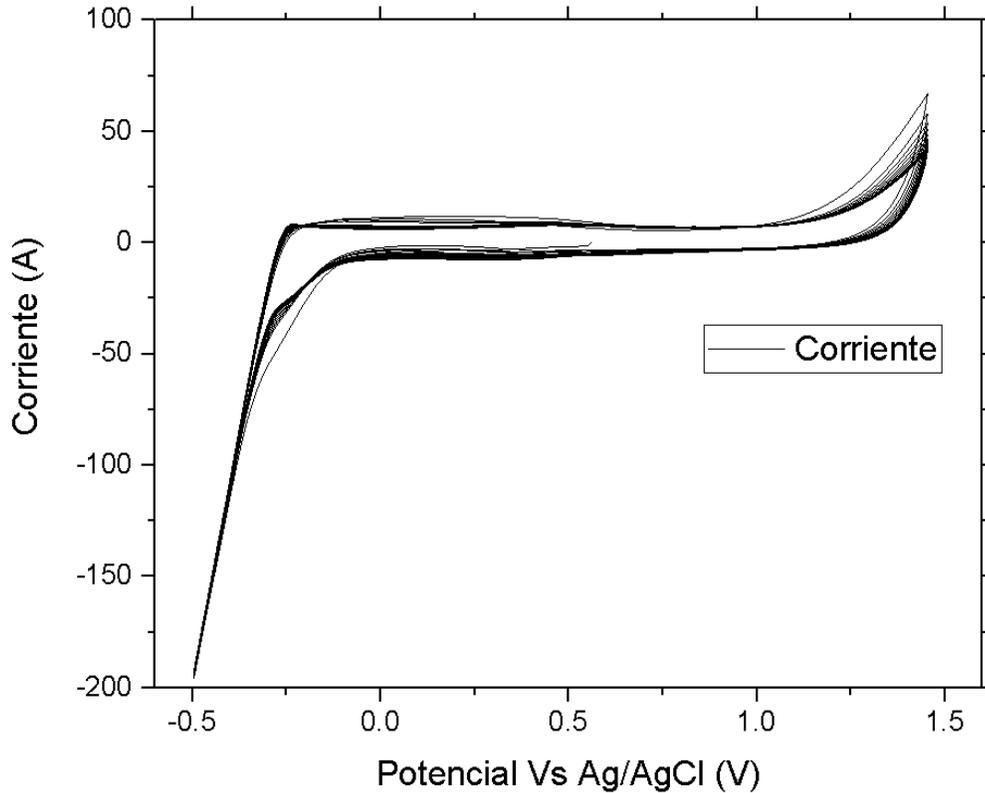


Figura. 20. Voltamperometría cíclica de la activación de CF

Posterior a la activación se procedió a la polimerización del monómero del rojo neutro que se realiza haciendo un barrido por voltametría cíclica de -1V a 1V por 90 ciclos en una solución de rojo neutro de 1mM PBS 0.025M y KNO₃ 0.1M para el “glassy carbón”. En la figura 21 se muestra el crecimiento del polímero sobre el electrodo de glassy carbón, en la A se observa el electrodo de frente donde se distingue el negro del “glassy carbón” la película que brilla en blanco sobre el electrodo y un crecimiento grande y abultado en la periferia del electrodo, en la B se observa el perfil del electrodo, donde resalta el polímero por encima de la superficie del electrodo.

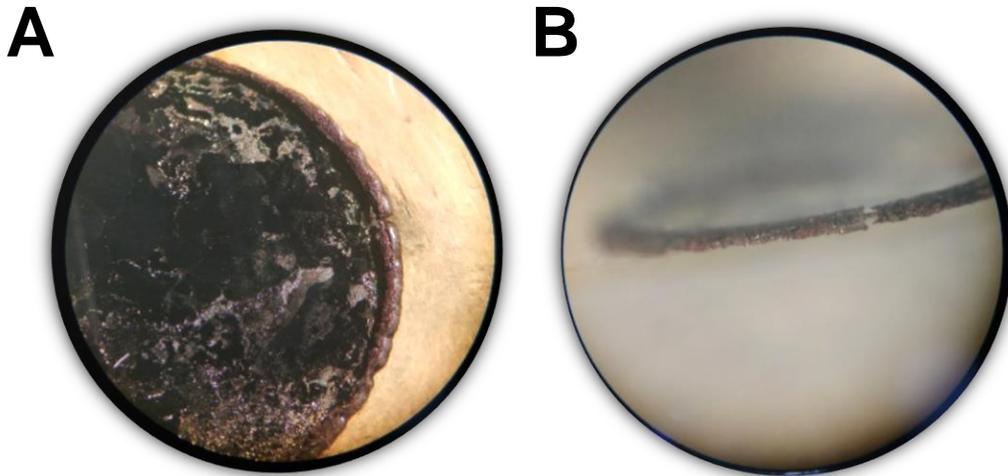


Figura. 21. Crecimiento del polímero de rojo neutro sobre glassy carbon.

También se realizó un ensayo sobre un electrodo de platino donde cabe resaltar que el polímero al secarse y ser grueso toma una coloración azulada como se puede observar en la siguiente figura 22. Por su parte el fieltro de grafito tiene un reflejo rojizo o azul posterior a la polimerización.

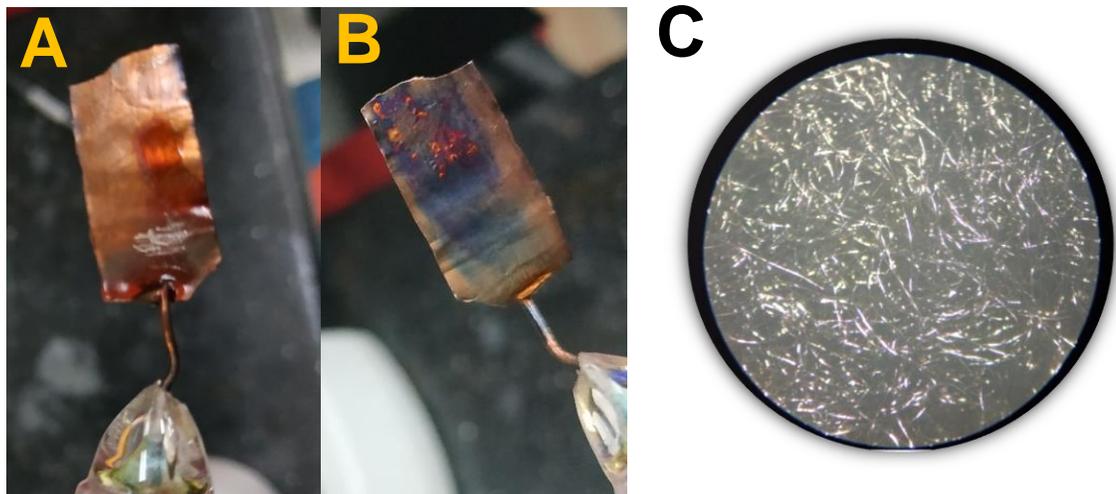


Figura. 22 Polimerización de NR sobre platino A, polimerización después de secarse B, y polimerización observada a microscopio estereoscópico del fieltro de grafito C.

Se realizaron polimerizaciones en estos diferentes electrodos para poder confirmar y visualizar el polímero a simple vista y confirmar el proceso, ya que se usaron las mismas condiciones que en la polimerización del fieltro y soluciones.

La polimerización del fieltro de grafito sobre el rojo neutro se realizó superando

los 20 ciclos que se tenían en la bibliografía (Karyakin, Karyakina, & Schmidt, 1999; Mardiana et al., 2015; Pauliukaite & Brett, 2008) ya que se observó que aun después de ese número de ciclos los picos en las curvas de la voltametría cíclica seguían aumentando por lo cual se mantuvo el proceso por 90 ciclos en una ventana de -1.5 a $1V$ a una velocidad de 50 mV/s en la solución de monómero antes mencionada. En la figura 23 se observa la voltamperometría típica de la polimerización del Rojo neutro sobre en Filtro de grafito utilizado en este proyecto. Se pueden observar dos picos de oxidación crecientes en densidad de corriente según el número de ciclos los cuales indican el crecimiento del polímero sobre el electrodo.

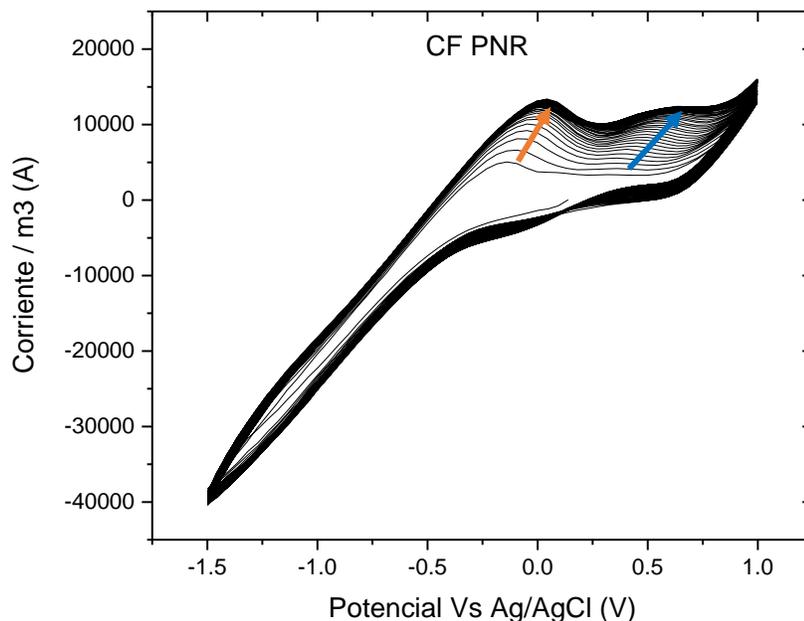


Figura. 23 Voltametría cíclica “tipo” de la polimerización con Rojo Neutro en fieltro de grafito normalizado por m^3 . Se observan picos a $-0.1V$ que se desplaza hasta 0.09 y 0.36 que crece a 0.63 .

La diferencia entre las voltamperometrías cíclicas obtenidas con el fieltro de grafito que se usó en ese proyecto con respecto a las voltamperometrías que se encuentran en la bibliografía se pueden deber a las características del fieltro de grafito utilizado, puede no ser tan gráfitico o tener una conexión entre las fibras menos eficiente lo que puede generar un desplazamiento de los picos de monómero y de la formación del polímero. El aumento en la cantidad de ciclos podría explicarse por fenómenos de

difusión de la solución del monómero en el interior del fieltro de grafito.

El resultado a simple vista del proceso después de la polimerización es el que se observa en la siguiente figura 24 donde se puede diferenciar el color gris del fieltro de grafito contra el color azul-negro sobre el fieltro de grafito con polímero de rojo neutro.

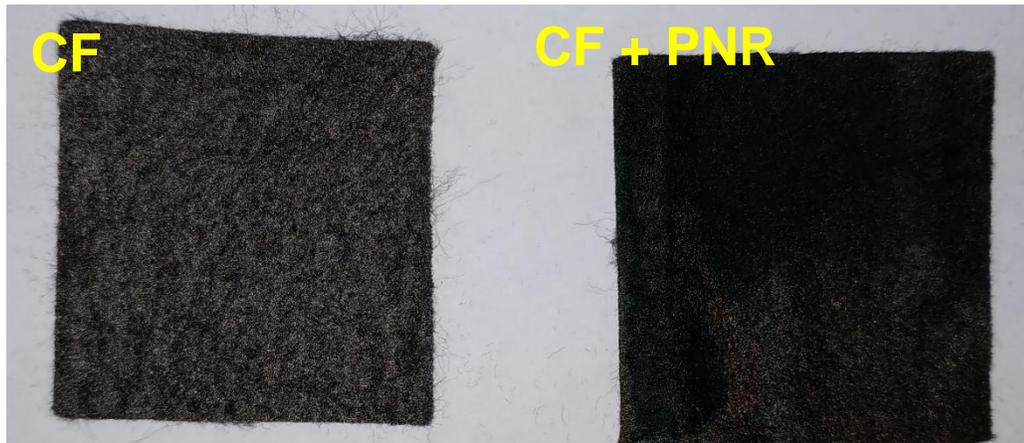


Figura. 24 Filtro de grafito antes y después de la polimerización del rojo neutro.

A continuación, se muestran las micrografías del *PNR* sobre el fieltro de grafito Figura 25 donde se puede observar una masa cubriendo la superficie del electrodo que cubre las marcas longitudinales de la fibra y que además se observan muy blancas, resultado de la carga del material es decir el polímero ya que no es tan conductor como el grafito.

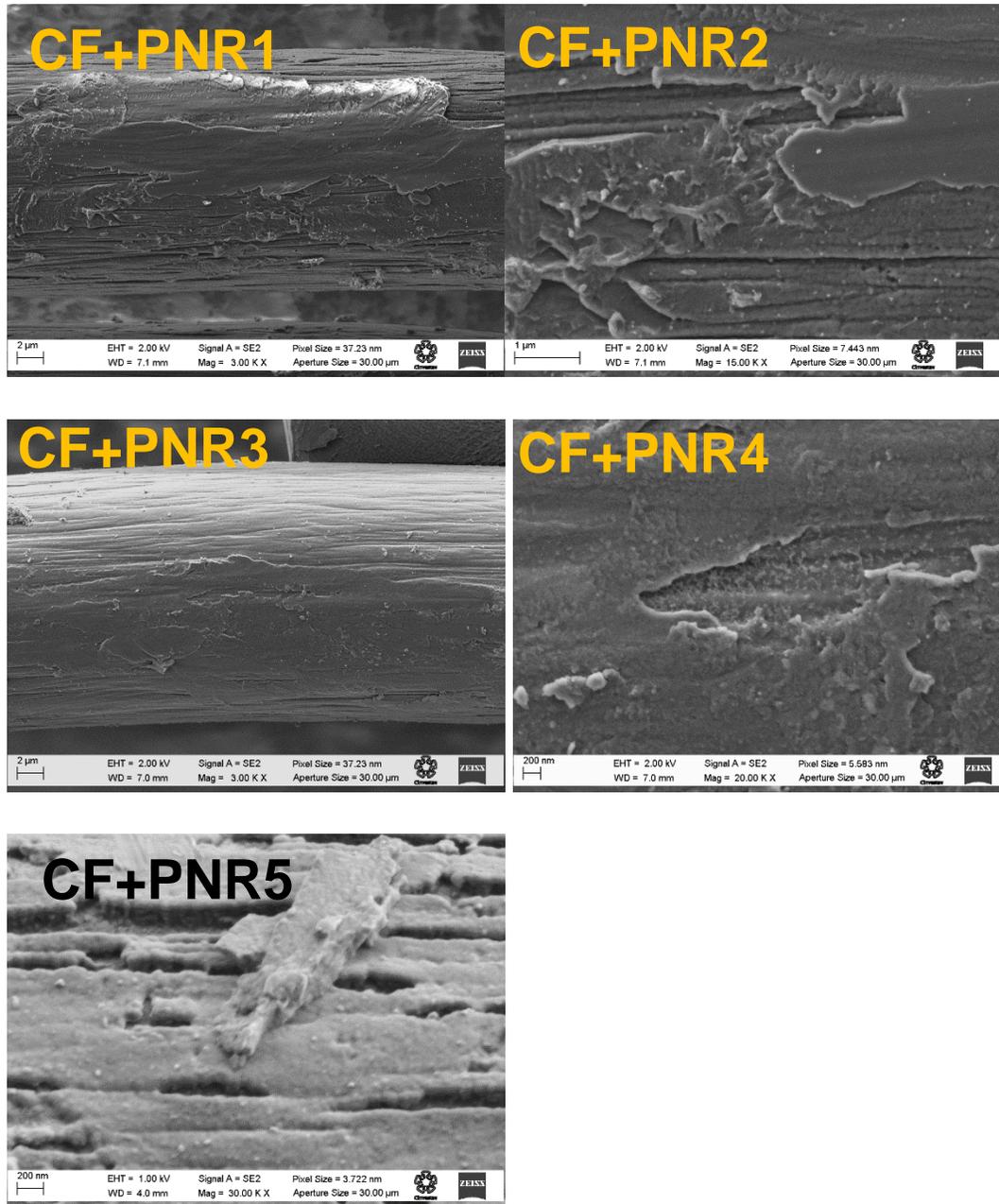


Figura. 25. Filtro de grafito recubierto con Rojo Neutro polimerizado

Se realizó un análisis de RAMAN de las fibras de fieltro de grafito CF, CF+PNR y de grafito. Se observa que la relación ID/IG del CF utilizado en este proyecto no es similar al del grafito puro, lo que puede indicar que el arreglo del CF no es tan grafitico y por lo tanto puede tener una conductividad menor que la del grafito. Lo que puede

explicar los desplazamientos entre los picos de oxidación y reducción del monómero y polímero sobre el electrodo, otra explicación de ese fenómeno puede ser la conductividad en general del material por las características, densidad y contacto entre las fibras que componen el CF.

En la siguiente figura 26 se muestra la comparación entre el CF y el CF+PNR donde se muestran con líneas verticales negras las longitudes de onda (cm^{-1}) que podrías estar relacionadas con el polímero de rojo neutro comparado con bibliografía como (Bisset & Dines, 1991; Mažeikienė et al., 2009). Aunque nuestro análisis presenta fluorescencia y algunos picos pueden verse atenuados se corrobora la presencia de otro compuesto sobre el fieltro de grafito.

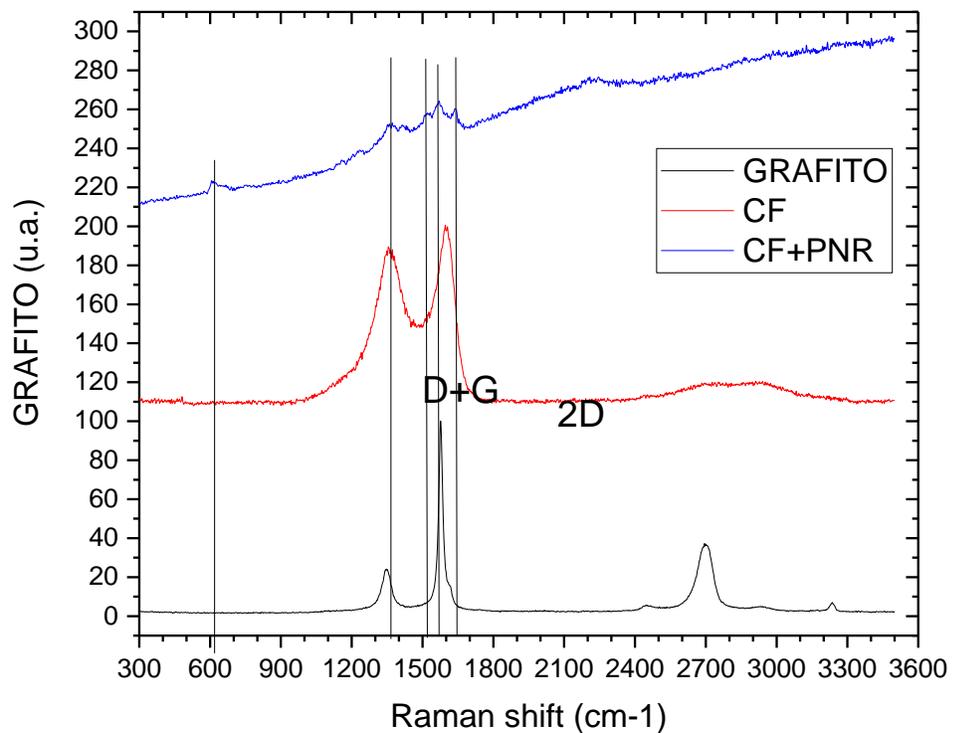


Figura. 26 Análisis de RAMAN del CF, G y CF +PNR. Las líneas verticales negras Corresponden a anillos quinonicos y a enlaces C=C y C=N

7.5. Evaluación del efecto de la 3ª cámara y el efecto de la modificación del cátodo sobre la concentración, purificación y producción de *H2Succ*

7.5.1. Efecto de la tercer cámara

Los resultados de rendimiento de la fermentación Ec.1, la concentración de *H2Succ* aparente por celda y el índice de uso energético $\epsilon_{H2Succ/ee}$ que relaciona la masa de *H2Succ* con la energía eléctrica consumida Ec. 3 y eficiencia de extracción Ec. 4 se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Tabla comparativa de las CESIM 3 y 2 cámaras (PONER DESV ESTÁNDARES)

Variable	3-C CELL	2-C CELL
Concentración aparente de <i>H2Succ</i> (g/L)	3.20	4.41
Rendimiento ($g_{H2Succ} / g_{\text{substrate consumed}}$)	0.171	0.240
Energía eléctrica consumida (kJ)	1.36	1.59
Índice $\epsilon_{H2Succ/ee}$ (g/kJ)	0.360	0.424
Eficiencia de extracción (%)	11.56	7.93

Los rendimientos nos muestran que la celda de 2 cámaras tiene mejor rendimiento que la CESIM de 3 cámaras, y en el índice de rendimiento energético la CESIM de 2 cámaras al tener mayor producción de *H2Succ* por J de energía suministrados por lo cual la celda de 3 cámaras tiene un desempeño 25% mejor al de la celda de 2 cámaras en rendimiento. Por su parte, aunque la CESIM3 tiene una eficiencia de extracción mayor que la CESIM 2. Ninguna de las dos obtiene eficiencias de extracción mayores a 90% como las observadas en estudios previos como el de Gildemyn (2015) esto podría explicarse en parte porque el estudio de Gildemyn tiene un tiempo de fermentación más largo de hasta 54 días.

Se transfirió el *H2Succ* y los productos concomitantes a la cámara intermedia, siendo favorecido el ácido fórmico, el ácido acético y finalmente el ácido succínico.

Las relaciones del producto deseado y los productos concomitantes así como con la concentración de azúcares en las diferentes cámaras se puede observar en la tabla 13 que en relación a los productos concomitantes existen más concomitantes en la cámara de “extracción o cámara intermedia que en la cámara catódica, lo cual no es deseado por que se preferiría que el *H2Succ* estuviera aislado de los demás, sin embargo al analizar qué tanto que separó el *H2Succ* de los azúcares del medio se observa también un incremento de la presencia de azúcares en la cámara intermedia contra la cámara catódica. Todo esto nos da una primera idea de que el producto de interés no se concentró ni purificó en la cámara intermedia con lo cual el diseño de 3 cámaras no funciona en la purificación y concentración de este producto. En contraste con lo reportado por Gildemyn (2015). Cabe mencionar que para los ensayos anteriormente reportados el medio de fermentación fue un medio homoacetogénico que no incluye la presencia de azúcares por lo cual no se había analizado el comportamiento de esta membrana para la presencia de azúcar.

Tabla 13. Relación de *H2Succ* con productos concomitantes y azúcares

	<i>H2Succ:concomitantes</i>		<i>Relación H2Succ:azúcares</i>	
	Cámara. catódica	Cámara. intermedia/anódica	Cámara. catódica	Cámara. intermedia/anódica
<i>CESIM 3</i> CÁMARAS	1:1.46	1:9.56	1:0.15	1:0.44
<i>CESIM 2</i> CÁMARAS	1:1.41	1:7.32	1:0.1721	1:6.05

CONCLUSION

La *CESIM* 3 con membrana Zirfon® no transfirió el *H2succ* ni ningún otro producto de fermentación a la cámara intermedia, mientras que la *CESIM*3 con la membrana Fumasep® presentó una transferencia positiva de *H2Succ*. La *CESIM* 3 con membrana Fumasep presentó un rendimiento de $0.171 \text{ g } H2Succ/g \text{ AR consumida neta}$, la energía total del sistema fue de 1.36kJ y transfirió el *H2succ* y los productos concomitantes a la cámara intermedia en el orden $HFor > HAc > H2Succ$. Presentó un Índice $\epsilon_{H2Succ/ee}$ 0.36 g/kJ. Por su parte la *CESIM*2 tuvo rendimiento fue de $0.24 \text{ g } H2Succ/g \text{ AR consumida neta}$ y la energía total en el sistema fue de 1.59 kJ y un Índice $\epsilon_{H2Succ/ee}$ 0.424 g/kJ.

El electrodo modificado con rGO presentó las láminas del rGO rodeando las fibras. El electrodo modificado con PNR tuvo un cambio de coloración y se observó el polímero rodeando las fibras.

La *CESIM* de 3 cámaras con membrana Zirfon® no transfirió el ácido succínico a la cámara intermedia. La *CESIM* 3 equipada con membrana Fumasep® presentó transferencia de *H2Succ* y compuestos concomitantes, aunque no se concentró el primero La *CESIM* de 2 cámaras tuvo mejor rendimiento de ácido succínico y uso de energía que la celda de 3 cámaras.

Nuestros resultados no validaron la hipótesis conceptual de concentrar y purificar el *H2succ* en una cámara intermedia en las condiciones de fermentación. Se logró modificar electrodos de fieltro de grafito con rGO y PNR con perspectivas a ser evaluadas en una *CESIM*.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aerts, P., Kuypers, S., Genné, I., Leysen, R., Mewis, J., Vankelecom, I. F. J., & Jacobs, P. A. (2006). Polysulfone - ZrO₂ surface interactions. The influence on formation, morphology and properties of zirconium-membranes. *Journal of Physical Chemistry B*, *110*(14), 7425–7430. <https://doi.org/10.1021/jp053976c>
- Aliyev, E., Filiz, V., Khan, M. M., Lee, Y. J., Abetz, C., & Abetz, V. (2019). Structural Characterization of Graphene Oxide: Surface Functional Groups and Fractionated Oxidative Debris. *Nanomaterials*, *9*(8), 1180. <https://doi.org/10.3390/nano9081180>
- Analyst, G. I. (n.d.). Succinic acid. Market analysis, trends and forecasts. Retrieved from <https://www.strategyr.com/market-report-succinic-acid-forecasts-global-industry-analysts-inc.asp>
- Aryal, N., Ammam, F., Patil, S. A., & Pant, D. (2017). An overview of cathode materials for microbial electrosynthesis of chemicals from carbon dioxide. *Green Chemistry*, *19*(24), 5748–5760. <https://doi.org/10.1039/c7gc01801k>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.03.035>
- Bisset, A., & Dines, T. J. (1991). Resonance Raman Spectroscopy of the Acid-Base Indicator Neutral Red. *Journal of Raman Spectroscopy*, *22*(July 1990), 101–106.
- Chen, K., Jiang, M., Wei, P., Yao, J., & Wu, H. (2010). Succinic acid production from acid hydrolysate of corn fiber by *Actinobacillus succinogenes*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *160*(2), 477–485. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8367-0>
- Chen, L., Tremblay, P. L., Mohanty, S., Xu, K., & Zhang, T. (2016). Electrosynthesis of acetate from CO₂ by a highly structured biofilm assembled with reduced graphene oxide-tetraethylene pentamine. *Journal of Materials Chemistry A*, *4*(21), 8395–8401. <https://doi.org/10.1039/c6ta02036d>
- Cheng, K.-K., Zhao, X.-B., Zeng, J., & Zhang, J.-A. (2012). Perspective: Jatropha cultivation in southern India: Assessing farmers' experiences. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *6*(3), 246–256. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Der Werf, M. J. Van, 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*(6), 332–342. <https://doi.org/10.1007/s002030050452>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.02.028>
- 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*, Vol. 38, pp. 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.12.007>
- 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 and Technology Letters*, *2*(11), 325–328. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.5b00212>
- Guettler, M. V., Rumler, D., & Jain, M. K. (1999a). *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *49*(1 999), 207–216. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10028265>
- Guettler, M. V., Rumler, D., & Jain, M. K. (1999b). Succinic-Acid-Producing Strain F From the Bovine Rumen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *49*(1 999), 207–216. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10028265>
- 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. <https://doi.org/10.1071/CH9830507c>
- Hamelers, H. V. M., & Heijne, A. Ter. (2010). *New applications and performance of bioelectrochemical systems*. 8038, 1673–1685. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2357-1>
- Hernández-Correa, E. (2018). *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*. CINVESTAV.
- Hernández-Correa, E., Poggi-Varaldo, H. M., Ponce-Noyola, M. T., Romero-Cedillo, L., Ríos-Leal, E., & Solorza-feria, O. (2017). Production of Value-Added products and Commodities by Electrofermentation and its Integration to Biorefineries. *Fourth International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies*, (May).
- Hummers, W. S., & Offeman, R. E. (1958). Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical Society*, *80*(6), 1339. <https://doi.org/10.1021/ja01539a017>

- Inamdar, S. N., Bhat, M. A., & Haram, S. K. (2009). Construction of Ag/AgCl reference electrode from used felt-tipped pen barrel for undergraduate laboratory. *Journal of Chemical Education*, *86*(3), 355–356. <https://doi.org/10.1021/ed086p355>
- Karyakin, A. A., Karyakina, E. E., & Schmidt, H. L. (1999). Electropolymerized azines: A new group of electroactive polymers. *Electroanalysis*, *11*(3), 149–155. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4109\(199903\)11:3<149::AID-ELAN149>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4109(199903)11:3<149::AID-ELAN149>3.0.CO;2-G)
- Kuypers, S., Genné, I., & Leysen, R. (1995). Surface characteristics of Zirfon® composite ultrafiltration membranes. *Journal of Microscopy*, *177*(3), 313–319. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1995.tb03562.x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.044>
- Luo, T., Abdu, S., & Wessling, M. (2018). Selectivity of ion exchange membranes: A review. *Journal of Membrane Science*, *555*(March), 429–454. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2018.03.051>
- Marcano, D. C., Kosynkin, D. V., Berlin, J. M., Sinitskii, A., Sun, Z., Slesarev, A. S., ... Tour, J. M. (2018). Correction to Improved Synthesis of Graphene Oxide. *ACS Nano*, *12*(2), 2078–2078. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b00128>
- Mardiana, U., Innocent, C., Jarrar, H., Cretin, M., Buchari, & Gandasasmita, S. (2015). Electropolymerized neutral red as redox mediator for yeast fuel cell. *International Journal of Electrochemical Science*, *10*(11), 8886–8898.
- Mažeikienė, R., Balskus, K., Eicher-Lorka, O., Niaura, G., Meškys, R., & Malinauskas, A. (2009). Raman spectroelectrochemical study of electrode processes at Neutral red- and poly(Neutral red) modified electrodes. *Vibrational Spectroscopy*, *51*(2), 238–247. <https://doi.org/10.1016/J.VIBSPEC.2009.06.001>
- McKinlay, J. B., & Zeikus, J. G. (2004). Extracellular iron reduction is mediated in part by neutral red and hydrogenase in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(6), 3467–3474. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3467-3474.2004>
- NNFFCC. (n.d.). Biobased products. Retrieved December 1, 2019, from <https://www.nnfcc.co.uk/biobased-products/>
- 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*(1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.08.010>
- 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.
- Park, Doo Hyun, & Zeikus, J. G. (2000). Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Using Neutral Red as an Electronophore. *Applied Environmental Microbiology*, *66*(4), 1292–1297. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1292-1297.2000>. Updated
- Pauliukaite, R., & Brett, C. M. A. (2008). Poly(neutral red): Electrosynthesis, characterization, and application as a redox mediator. *Electroanalysis*, *20*(12), 1275–1285. <https://doi.org/10.1002/elan.200804217>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.05.035>
- Qiu, R., Yin, S., Zhang, X., Xia, J., Xu, X., & Luo, S. (2009). Synthesis and structure of an air-stable cationic organobismuth complex and its use as a highly efficient catalyst for the direct diastereoselective Mannich reaction in water. *Chemical Communications*, (31), 4759–4761. <https://doi.org/10.1039/b908234d>
- Rabaey, K., & Rozendal, R. A. (2010). Microbial electrosynthesis - Revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(10), 706–716. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2422>
- Ranucci, E., Liu, Y., Söderqvist, M., & Albertsson, A.-C. (2000). New biodegradable polymers from renewable sources. High molecular weight poly (ester carbonate)s from succinic acid and 1, 3-propanediol. *Macromolecular Rapid Communications*, *21*(10), 680–684. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1521-3927\(20000601\)21:10<680::AID-MARC680>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1521-3927(20000601)21:10<680::AID-MARC680>3.0.CO;2-Y)
- Salvachúa, D., Mohagheghi, A., Smith, H., Bradfield, M. F. A., Nicol, W., Black, B. A., ... Beckham, G. T. (2016). Biotechnology for Biofuels Succinic acid production on xylose - enriched biorefinery streams by *Actinobacillus succinogenes* in batch fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0425-1>
- Shahriary, L., & Athawale, A. a. (2014). Graphene Oxide Synthesized by using Modified Hummers Approach. *International Journal of Renewable Energy and Environmental Engineering*, *02*(01), 58–63.
- Shen, N., Wang, Q., Qin, Y., Zhu, J., Zhu, Q., Mi, H., ... Huang, R. (2014). Optimization of succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes* GXAS137 using response surface methodology (RSM). *Food Science and Biotechnology*, Vol. 23, pp. 1911–1919. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0261-7>
- Song, H., & Lee, S. Y. (2006). Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial*

- Technology*, 39(3), 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.043>
- Technology, C. (n.d.). Myriant Technologies Bio-Based Succinic Acid Plant, US. Retrieved November 8, 2019, from <https://www.chemicals-technology.com/projects/myriant-plant/>
- Tremblay, P. L., Angenent, L. T., & Zhang, T. (2017). Extracellular Electron Uptake: Among Autotrophs and Mediated by Surfaces. *Trends in Biotechnology*, 35(4), 360–371. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.10.004>
- Wang, Z., Li, H., Feng, J., Zhang, A., Ying, H., He, X., ... Ouyang, P. (2018). Enhanced succinic acid production from polyacrylamide-pretreated cane molasses in microbial electrolysis cells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 93(3), 855–860. <https://doi.org/10.1002/jctb.5440>
- Xu, J., & Guo, B. (2010). Poly (butylene succinate) and its copolymers : Research , development and industrialization. *Biotechnology Journal*, 5, 1149–1163. <https://doi.org/10.1002/biot.201000136>
- Yu, J., Li, Z., Ye, Q., Yang, Y., & Chen, S. (2010). Development of succinic acid production from corn cob hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(10), 1033–1040. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0750-5>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.081>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s002530051431>
- Zhang, C., Liang, P., Yang, X., Jiang, Y., Bian, Y., Chen, C., ... Huang, X. (2016). Binder-free graphene and manganese oxide coated carbon felt anode for high-performance microbial fuel cell. *Biosensors and Bioelectronics*, 81, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.02.051>
- Zhang, T., Nie, H., Bain, T. S., Lu, H., Cui, M., Snoeyenbos-West, O. L., ... Lovley, D. R. (2013). Improved cathode materials for microbial electrosynthesis. *Energy and Environmental Science*, 6(1), 217–224. <https://doi.org/10.1039/c2ee23350a>
- Zhao, Y., Cao, W., Wang, Z., Zhang, B., Chen, K., & Ouyang, P. (2016). Enhanced succinic acid production from corn cob hydrolysate by microbial electrolysis cells. *Bioresource Technology*, 202, 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.002>

9. ANEXOS

Anexo 1. Diseño de placas de acrílico

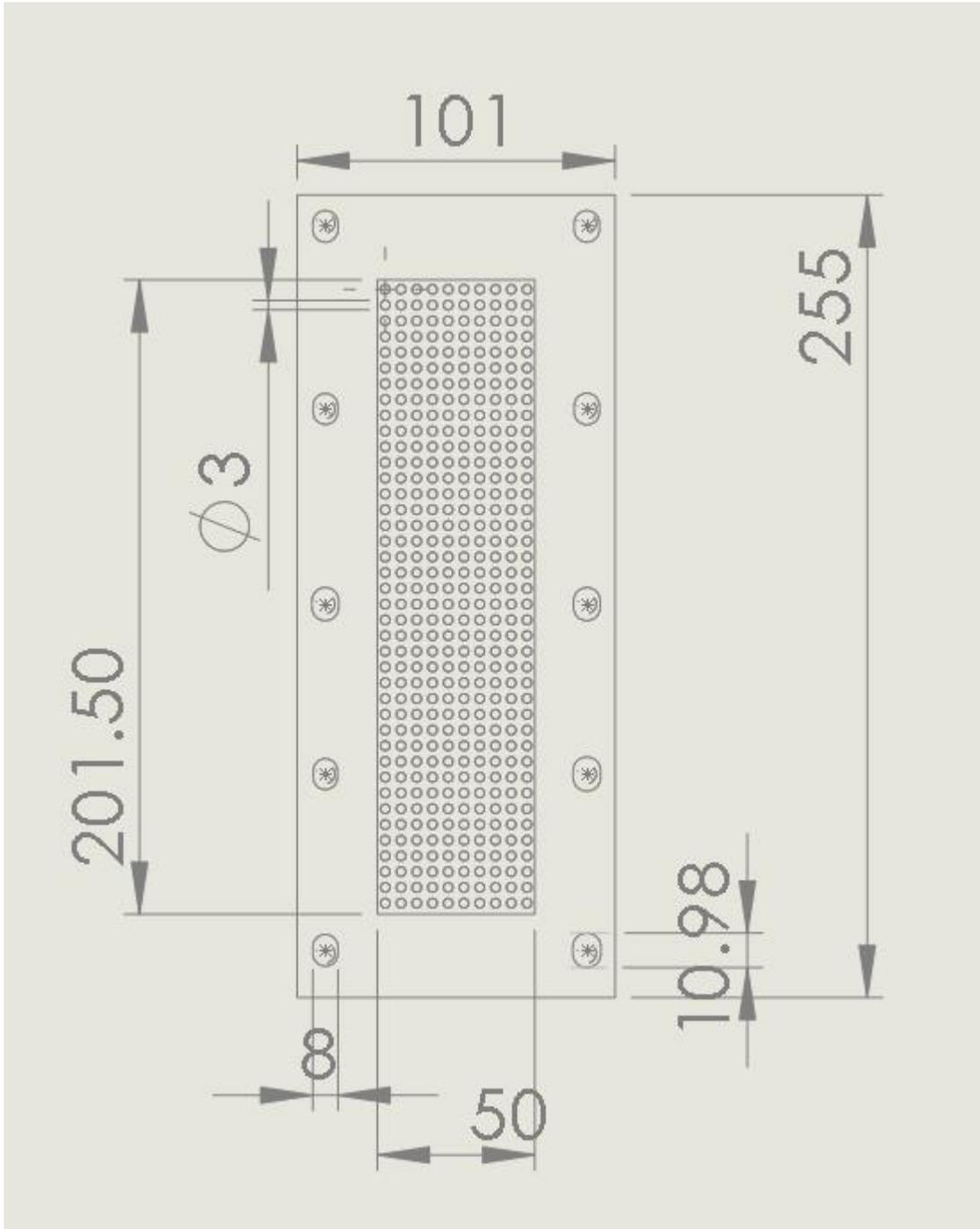


Figura. 27 Diseño de placas de acrílico perforadas para la *CESIM* adaptable a 2 y 3 cámaras.

Anexo 2. Diseño del puerto de muestreo

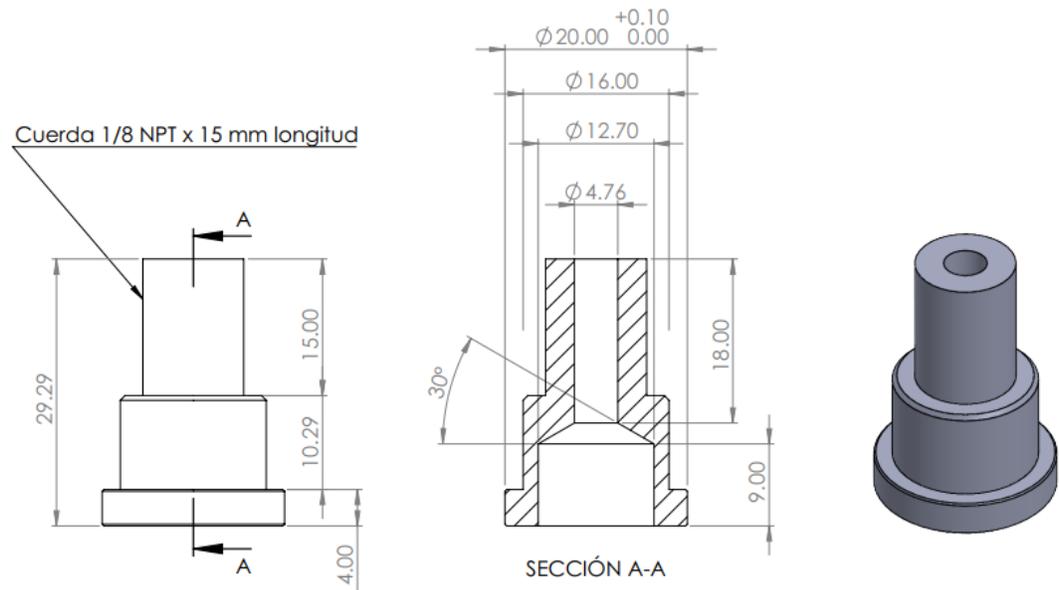
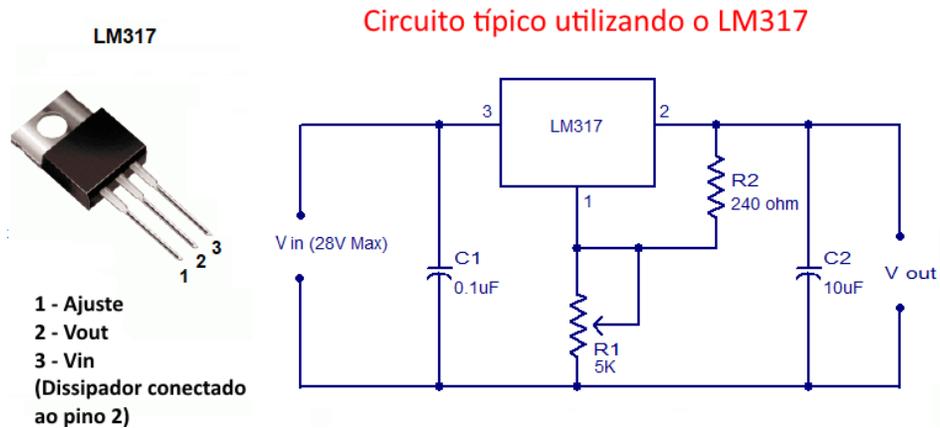


Figura. 28. Diagrama de diseño del puerto de muestreo para cada cámara de la CESIM

Anexo3. Circuito y fuente de poder utilizada para administrar voltaje al sistema



Fuente de Ag electronics de 12V (AG Electrónica SAPI de CV) conectada a una fuente de poder variable que varía de 1.2 a 9.84 V y suministra de 0 a 25.65 mA.

Figura. 29. Diagrama de circuito de la fuente de poder variable

Anexo 4. Esquema del arreglo de la celda de 3 cámaras

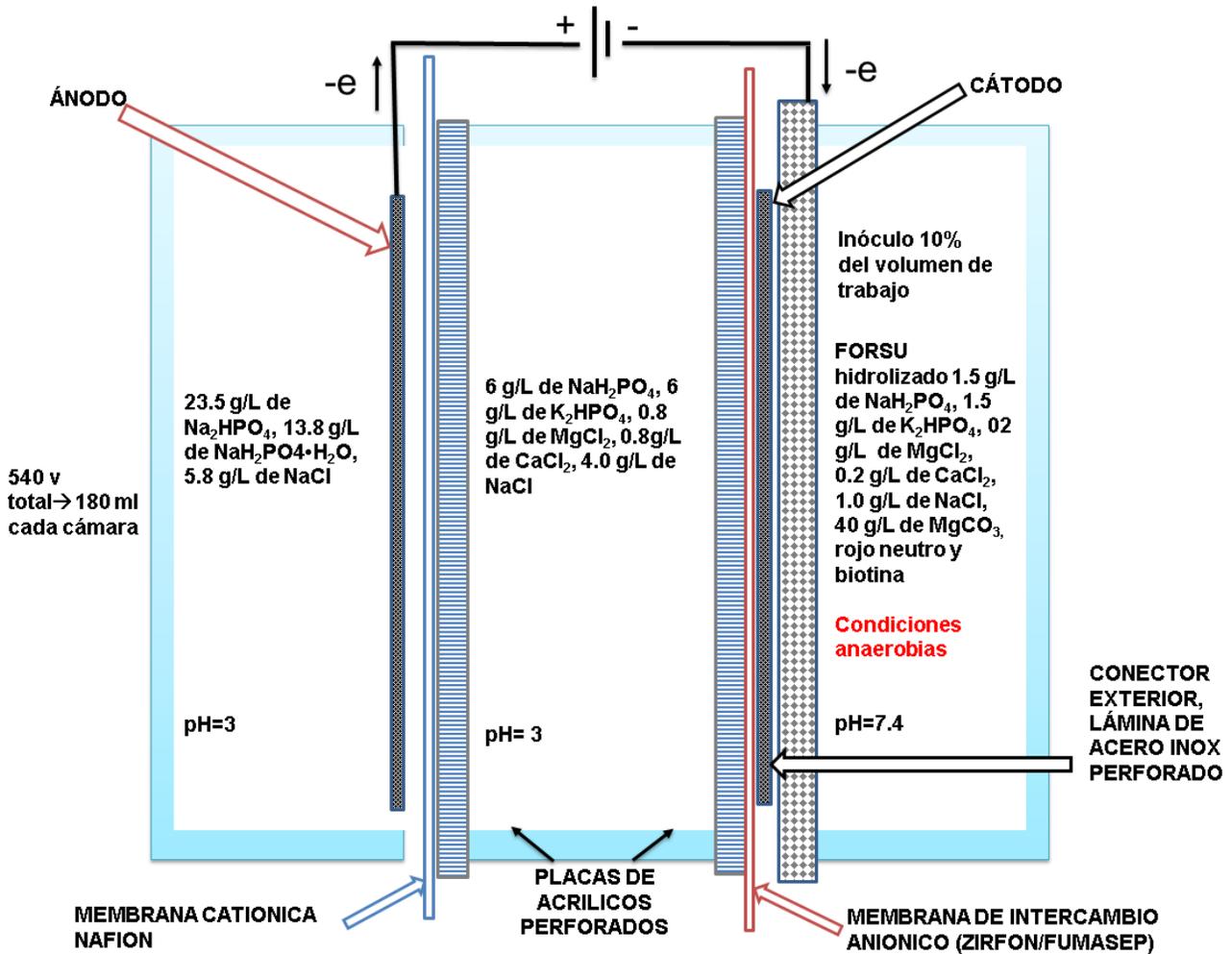


Figura. 30. Diagrama descriptivo de la configuración y contenido de la celda de electrosíntesis microbiana de 3 cámaras.

Anexo 5. Proceso de síntesis de óxidos de grafeno por Hummer's modificado.

Material base (grafito) → agitación en frío → después de la reacción y agitación por 14 horas con KMnO_4 → reacción con H_2O_2 → liofilizado de GO → liofilizado raspado → liofilizado pulverizado.



Figura. 31. Descripción de la síntesis de óxido de grafeno siguiendo el método de Hummers modificado. Adaptado de Hummers (*Hummers & Offeman, 1958*) por (*Mardiana et al., 2015*).

Anexo 6. Arreglo del sistema de tres electrodos para la polimerización del rojo neutro

El arreglo del sistema de tres electrodos utilizado para la polimerización, que se compone de lo siguiente, un electrodo de trabajo de fieltro de grafito sujetado al sistema con un alambre de platino y postes de paladio para mejorar el contacto del electrodo. Un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un contraelectrodo de platino. El de la derecha muestra la disposición de los elementos previo al llenado con la solución del monómero de rojo neutro.

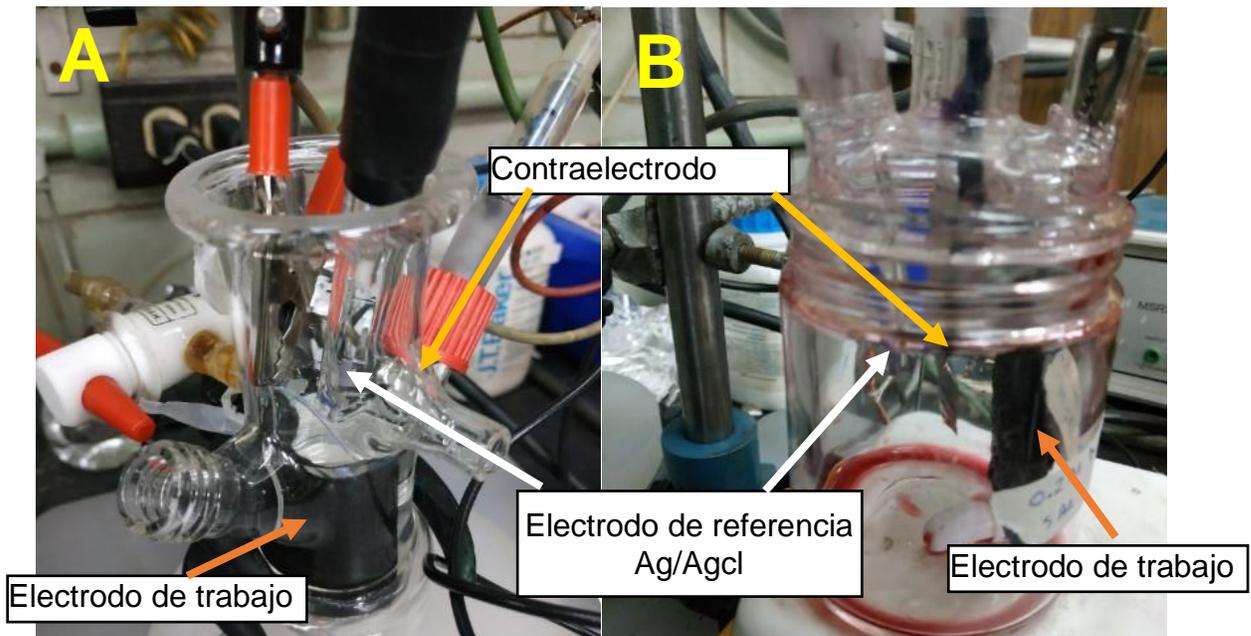
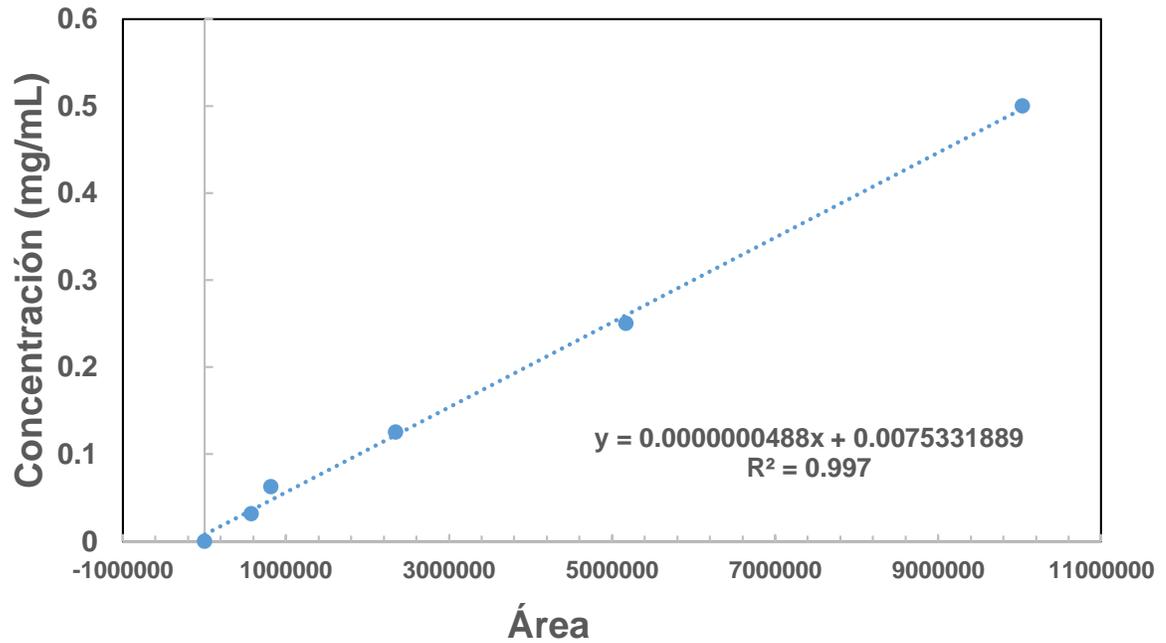
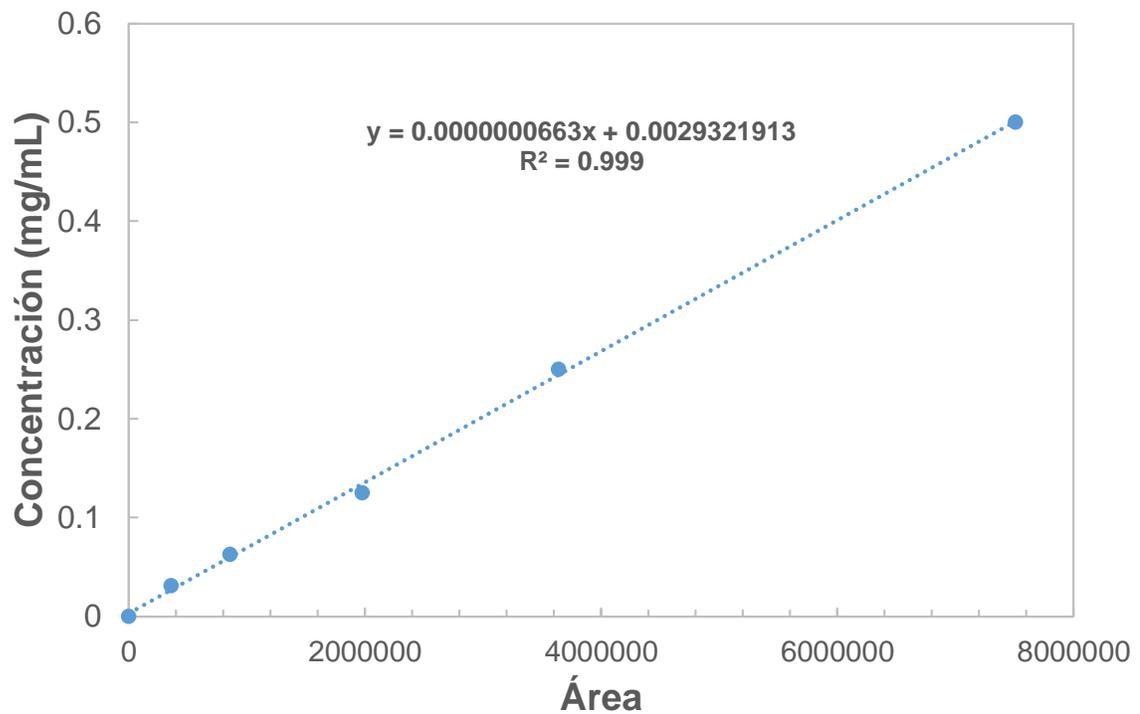


Figura. 32. Celda de tres electrodos utilizada para la polimerización del colorante Rojo Neutro (A) vista general (B) detalle de electrodos

Anexo 7. Curvas de calibración de *H2Succ* y concomitantes**Figura. 33. Curva de calibración de ácido succínico por HPLC****Figura. 34. Curva de calibración de ácido acético por HPLC**

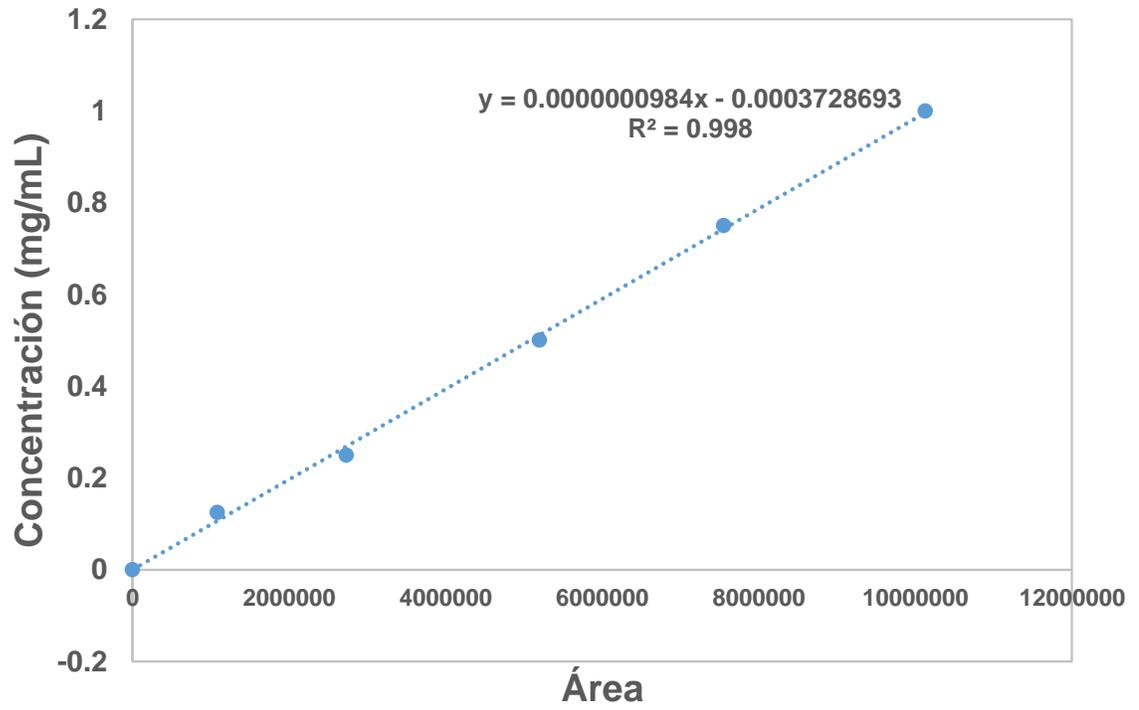


Figura. 35. Curva de calibración de ácido fórmico por HPLC