



PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE BIOMASA POR MEDIO DE FERMENTACIÓN OSCURA: UNA REVISIÓN

Hydrogen production from biomass by means of dark fermentation: a review

 Orlando Castiblanco Urrego*
 David Stiven Guerrero Escárraga

Fundación Universidad de América, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química, Bogotá, Colombia.

*orlando.castiblanco@profesores.uamerica.edu.co

RESUMEN

El hidrógeno es un vector energético y una materia prima industrial que se puede obtener por diferentes métodos, entre los que se tiene la fermentación oscura, y a partir de diferentes fuentes de biomasa, donde las condiciones y el rendimiento se ven afectados por el pH, el inóculo, el sustrato, los nutrientes, la temperatura y el tipo de reactor. Los géneros bacterianos *Enterobacter*, *Bacillus* y *Clostridium*, dadas sus características fisicoquímicas, generan unos rendimientos aproximadamente de 2 mol H₂/mol glucosa. El artículo destaca que este proceso presenta ventajas significativas, como la utilización de materias primas renovables y la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero en comparación con los métodos tradicionales basados en combustibles fósiles. Además, se destaca la importancia del rol del ingeniero químico de cara a mejorar la eficiencia y la estabilidad del proceso, a superar los desafíos técnicos y a mitigar los efectos adversos sobre el medio ambiente.

Palabras Clave: *Hidrógeno, fermentación oscura, medio ambiente, biomasa y energía.*

ABSTRACT

Hydrogen is an energy carrier and an industrial raw material that can be obtained through various methods, among which dark fermentation is included, and from different biomass sources, where conditions and yield are influenced by pH, inoculum, substrate, nutrients, temperature, and reactor type. The *Enterobacter*, *Bacillus* and *Clostridium* bacterial genera, given their physicochemical characteristics, yield approximately 2 mol H₂/mol glucose. The article highlights that this process offers significant advantages, such as the use of renewable raw materials and the reduction of greenhouse gas emissions compared to traditional methods based on fossil fuels. Furthermore, the importance of the role of the chemical engineer is emphasized in enhancing process efficiency and stability, overcoming technical challenges, and mitigating adverse effects on the environment.

Keywords: *Hydrogen, dark fermentation, environment, biomass and energy.*

I. INTRODUCCIÓN

Con el crecimiento poblacional, cada vez se requiere más energía para suplir todas las actividades diarias de la sociedad como transporte, industria, actividad doméstica, entre otros. Por tal razón, se han venido realizando muchas investigaciones sobre cómo hacer una transición energética segura y eficaz, ya que el uso de combustibles fósiles genera gases de efecto invernadero (GEI) que contribuyen a exacerbar los efectos del cambio climático. Una de las soluciones más atractivas es la producción de bio-hidrógeno como combustible a partir de biomasa en reemplazo de los derivados del petróleo y principalmente del gas natural, ya que su composición está libre de carbono (1, 2).

Con relación a lo anterior, el mundo se ha fijado la meta de ser carbono neutral a más tardar en el 2050 (3), y gracias a esto se ve una oportunidad muy grande en la producción de hidrógeno para hacer la tan anhelada transición energética y ponerle un alto al avance del cambio climático (4). En el aspecto económico, se sabe que el costo del hidrógeno como portador de energía no contaminante será más estable y rentable que cualquier otra fuente (5).

Hoy en día el gas de hidrógeno se obtiene en promedio un 40% a partir de gas natural, 30% del petróleo, 18% del carbón, 4% por electrolisis y 1% a partir de biomasa (6).

El hidrógeno se puede obtener a partir de múltiples vías, como el reformado de hidrocarburos, que es un proceso termoquímico y actualmente es el método más utilizado para la producción de hidrógeno. También se tiene la electrolisis de agua, que es un proceso electroquímico que disocia la molécula del agua en sus dos componentes, hidrógeno y oxígeno; la gasificación del carbón, un proceso donde se realiza una oxidación parcial que genera una mezcla de gases, mayoritariamente monóxido de carbono e hidrógeno; la termólisis del agua, que consta de la descomposición de agua por medios térmicos mediante un proceso por ciclos a una temperatura aproximada de 1000 K; procesos fotoquímicos, donde la producción de hidrógeno se efectúa por la disociación del agua por medio de radiación solar usando foto catalizadores químicos; la biofotólisis del agua, que consiste en aprovechar la luz para disociar la molécula del

agua; reformado de etanol y azúcares, y también por medio de fermentación oscura a partir de biomasa (7,8).

La obtención de hidrógeno por medio de fermentación oscura a partir de diversas fuentes de biomasa se da principalmente por bacterias aerobias y anaerobias facultativas del género *Clostridium* formadoras de esporas, facultativas de los géneros *Enterobacter* y *Bacillus* (9), algunas bacterias termofílicas (10) y acidogénicas anaerobias provenientes de lodos (11). Aquí los monosacáridos son la principal fuente de carbono, donde se destaca particularmente la glucosa, seguido de la xilosa, el almidón, la celulosa y otras fuentes que pueden ser generadas a partir de hidrólisis de polisacáridos, proteínas y lípidos, y por esta vía se da la reacción de biotransformación (12).

Por otro lado, con el creciente consumo mundial de energía, se estima que en el año 2050, para abastecer los vehículos de energía, se necesitarán 110 millones de toneladas de hidrógeno (13); ya que, las aplicaciones más comunes del hidrógeno se encuentran en la industria del transporte terrestre, como combustible de autos y camiones; también, en la industria aeroespacial, la producción de electricidad, la síntesis de amoníaco y fertilizantes, la refinación de metales y el calentamiento (14).

II. METODOLOGÍA

En esta revisión, se pretende presentar una visión completa sobre el biohidrógeno desde la perspectiva general del hidrógeno como materia prima y como vector energético, considerando las diferentes tecnologías de producción y profundizando en la fermentación oscura como una forma viable de producirlo. Varios estudios han presentado la biomasa como una materia prima para obtener hidrógeno; sin embargo, a lo largo de este estudio de revisión, se presenta de manera descriptiva la fermentación oscura, sus características y las variables de proceso más relevantes; por lo tanto, se hace necesario conocer los diferentes tipos de biomasa que pueden utilizarse, así como los microorganismos más adecuados para realizar un proceso sostenible debido a la alta capacidad de producción de H₂, combinada con la obtención de otros



subproductos de alto interés y valor comercial. Por último, se revisa brevemente el impacto ambiental asociado con el uso de las diferentes tecnologías relacionadas con la producción de hidrógeno, en contraste con la fermentación oscura, y el papel de la ingeniería química y su contribución al establecimiento de la economía del hidrógeno.

Para la realización de este trabajo se recurrió a una búsqueda exhaustiva en Internet, por medio de diversas bases de datos como Scopus, Google Scholar y Researchgate, haciendo una clasificación según el número de citas. La mayoría de las fuentes corresponden a artículos científicos publicados en los últimos diez años, sin dejar de tener en cuenta documentos de años anteriores de gran importancia que fueron referencia para investigaciones posteriores. A continuación, se organizó la información relacionada con la obtención de hidrógeno a partir de biomasa por medio de fermentación oscura, cuyas palabras claves conformaron la ecuación de búsqueda para la realización del análisis bibliométrico.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Métodos de obtención de hidrógeno

- *Reformado de metano*

El reformado de metano con vapor es un proceso utilizado a lo largo de varias décadas y es una de las tecnologías más económicas que se utiliza en la actualidad en la producción industrial de H₂ (15). La reacción se efectúa a 870 °C sobre un catalizador de níquel empacado en los tubos de un horno de reformación produciendo CO y H₂, después el CO producido reacciona con vapor de agua para formar hidrógeno adicional en la reacción de desplazamiento con agua. Este método tiene otras variantes como el reformado en seco, el reformado autotérmico, entre otros (7).

- *Electrólisis de agua*

Cuando los volúmenes de hidrógeno no son elevados, el hidrógeno se obtiene por electrólisis. La reacción electrolítica se suele realizar en medio alcalino, debido a que en estas condiciones se incrementa la conductividad eléctrica. El hidrógeno producido en el cátodo se debe purificar, ya que contiene impurezas de oxígeno y un cierto nivel de humedad. La purificación se

realiza por medio de secado con un adsorbente, y las impurezas de oxígeno se eliminan con un convertidor DeOx (16).

En la electrólisis, una corriente eléctrica divide el agua en hidrógeno y oxígeno, se utiliza 4,9 - 5,6 kWh por cada m³ de hidrógeno producido, lo que resulta al menos dos veces más costoso que el hidrógeno obtenido por reformado de gas natural (17). También se tiene la electrólisis de membrana polimérica protónica (PEM, por sus siglas en inglés), que consiste en utilizar una membrana de intercambio de protones y un electrolito polimérico sólido (18).

- *Reformado de líquidos renovables*

Los combustibles líquidos renovables, como el etanol, pueden reaccionar con vapor a altas temperaturas (2). Entre los líquidos de carácter renovable más utilizados actualmente destacan, el bioetanol principalmente, el biodiesel y el glicerol. El bioetanol se presenta como la principal alternativa al CH₄ como fuente de hidrógeno debido a las grandes cantidades que se producen y a la existencia de excedentes disponibles en algunos países, en comparación con el resto de biocombustibles (19).

- *Pirólisis*

Proceso termoquímico que ocurre en ausencia de oxígeno. Consiste en la dosificación y alimentación de materia prima a un reactor (combustibles, madera, carbón vegetal, carbón, biomasa, etc.), la transformación de la materia orgánica; y finalmente, la obtención y separación de los productos obtenidos como hidrógeno, metano y otros. Algunas variantes del proceso son la pirólisis acuosa, anhidra y al vacío (20, 21).

- *Fotofermentación*

La fotofermentación es un proceso de transformación de materia orgánica en hidrógeno, empleando la luz solar como catalizador del metabolismo (22). Los microorganismos responsables son principalmente bacterias púrpuras de los géneros *Rhodospseudomonas* y *Rhodobacter*, organismos heterótrofos que precisan de una fuente de carbono como fuente de electrones (23).

- *Biofotólisis del agua*

Proceso biológico de producción de hidrógeno a partir de la hidrólisis del agua por fotosíntesis,

empleando luz solar como catalizador de la reacción. Consiste en la ruptura del agua en oxígeno y protones, llevada a cabo por microorganismos fotosintéticos como cianobacterias (24,25).

- *Celda de electrólisis microbiana*

La celda de electrólisis microbiana es un sistema que utiliza la actividad de microorganismos electroactivos para convertir materia orgánica en electricidad o productos químicos como H₂. Es una tecnología en desarrollo con potencial para contribuir a la producción de energía renovable y el tratamiento sostenible de aguas residuales (26,27).

La fermentación oscura es otro método que puede emplearse para la producción de hidrógeno del cual se hablará a continuación. Los procesos de obtención de hidrógeno biológico exclusivamente se resumen en la Figura 1.

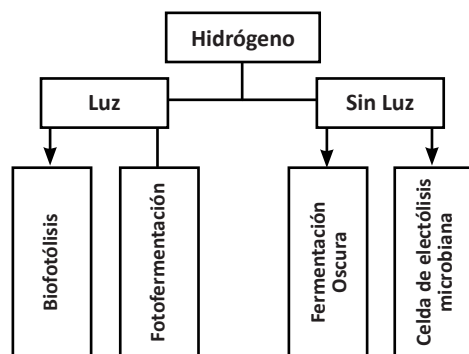


Figura 1. Obtención de hidrógeno biológico. Elaboración propia basada en (28).

B. La fermentación oscura como método de producción de biohidrógeno

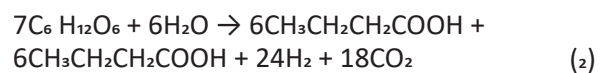
Mediante diversas investigaciones se ha llegado a producir hidrógeno por un método denominado fermentación oscura, que también suele llamarse fermentación de hidrógeno oscuro (29). Este método se lleva a cabo principalmente a partir de la degradación de carbohidratos (azúcares); usualmente, los monosacáridos son la principal fuente de carbono, donde se destaca la glucosa, el almidón, la celulosa, la xilosa y otras fuentes, lo que lo hace un método ventajoso respecto a otros, porque esta fuente es relativamente barata y tiene bajas demandas de energía (30). La fermentación oscura se caracteriza por ser un fenómeno omnipresente en condiciones anóxicas o anaeróbicas. Las bacterias utilizan la reducción

de protones a hidrógeno a través de hidrogenasa como medio para oxidar los transportadores reducidos durante la fermentación, lo cual permite que los transportadores se reciclen y mantengan la neutralidad eléctrica para que el sustrato pueda generar un suministro continuo de adenosín trifosfato (ATP) (31).

La producción de hidrógeno por este método es dada por bacterias anaeróbicas que crecen en oscuridad y usan sustratos ricos en carbohidratos. Los subproductos de la fermentación lo constituyen: ácido acético, con rendimiento de un máximo teórico de 4 mol H₂/mol glucosa (32); y ácido butírico, con un rendimiento de un máximo teórico de 3,4 mol H₂/mol glucosa. Con lo que los rendimientos prácticos de hidrógeno en la fermentación oscura están alrededor de 2 mol H₂/mol glucosa (33).

Diversos estudios han demostrado que el hidrógeno fermentativo se puede producir a través de cultivos microbianos acidogénicos mixtos o a través de cultivos definidos y puros de microorganismos productores (34).

Las principales reacciones son (35):



Respecto a las temperaturas más óptimas para producir hidrógeno por medio de la fermentación se tiene: desde mesófilas [25 - 40 °C]; hasta termófilas [40 - 65 °C] (10, 36); extremófilas [65 - 80 °C], e hipertermófilas [>80 °C] (34); produciéndose biogás con algunos elementos como H₂, CO₂, CO, H₂S y, en algunos casos muy raros, CH₄ (37).

Algunos resultados de investigaciones han llegado a conclusiones de que los microorganismos termófilos y, en particular los termófilos extremos y los hipertermófilos, son los más opcionados para producir hidrógeno a partir de biomasa, ya que el aumento de la temperatura mejora la cinética de reacción y por consiguiente mejora el rendimiento final del proceso (38, 39).

Los principales microorganismos termófilos que



se han estudiado incluyen *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (40), *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Thermotoganolitana* y *Thermotoga marítima* (41).

Las especies bacterianas más conocidas que producen hidrógeno por este sistema son los géneros *Enterobacter*, *Bacillus* y *Clostridium*, que generan buenos rendimientos (42, 43).

La producción de hidrógeno depende también de otros factores que afectan el rendimiento durante el proceso, como lo es el pH, que de acuerdo a diversos estudios su valor óptimo es de 5,5 (44); la presión parcial del gas, que no debe ser alta, ya que inhibe la producción de hidrógeno (45); inóculo, sustrato, tipo de reactor (46); nutrientes, como nitrógeno, fosfato, iones metálicos, y la temperatura (47). Estos factores se resumen en la Tabla 1.

Factor	Descripción
Inóculo	Género <i>Clostridium</i> y <i>Enterobacter</i>
pH cultivo	4,5 - 6,0
Sustrato	Glucosa, sacarosa, almidón y algunas veces residuos orgánicos.
Temperatura	De 15 hasta 85 °C, en rango mesofílico [25 - 40 °C], termofílico [40 - 65 °C], extremofílico [65 - 80 °C] e hipertermofílico [>80 °C].
Nutrientes	Nitrógeno, los fosfatos y algunos iones metálicos
Reactor	Reactor de tanque agitado

Tabla 1. Factores que afectan la producción de hidrógeno. Elaboración propia basada en (11, 42, 43, 44, 45, 46, 47).

Para maximizar la cantidad producida de hidrógeno, el metabolismo de la bacteria debe enfocarse hacia la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) (48).

C. Tipos de biomasa utilizada

Para la producción de hidrógeno se utilizan diferentes tipos de biomasa que contengan materiales ricos en carbohidratos o azúcares fermentables, y se requiere de condiciones específicas para maximizar la producción de hidrógeno. Diferentes cepas de microorganismos y diferentes fuentes de biomasa pueden requerir ajustes en las condiciones de fermentación para obtener un rendimiento óptimo de hidrógeno (49). Algunos ejemplos de biomasa utilizada para la fermentación biológica del hidrógeno incluyen: residuos de cultivos ricos en almidón,

como maíz, patatas, yuca, arroz, entre otros; residuos de procesamiento de alimentos, como residuos de la industria azucarera, residuos de panadería y almidones de residuos de la industria alimentaria; residuos de la industria papelería, como lignocelulosa, que puede ser tratada para liberar azúcares fermentables; y residuos orgánicos municipales, como residuos de alimentos y otros materiales orgánicos que contengan carbohidratos (50). A lo largo de varias investigaciones realizadas se han obtenido diferentes resultados respecto al uso de biomasa lignocelulósica (51). Lo anterior se presentan en la Tabla 2.

Biomasa	mol H ₂ /mol glucosa	Referencia
Miscanthus	3,3	(41)
Sorgo dulce bagazo	2,6	(52)
Caña de azúcar bagazo	1,7	(53)
Paja de trigo	2,6	(54)
Paja de arroz	0,8	(55)
Rastrojo de maíz	3,0	(56)
Pulpa de zanahoria	2,8	(57)
Fibras de madera	1,3	(58)
Lodos de papel	2,1	(59)

Tabla 2. Rendimiento de producción de hidrógeno de diversas biomásas. Elaboración propia.

D. Pretratamiento de la biomasa

El pretratamiento se realiza para romper la capa de lignina que protege la celulosa y la hemicelulosa, para que la biomasa sea más accesible a la digestión, también ayuda a disminuir la cristalinidad de la celulosa y aumentar la porosidad (60). El pretratamiento se puede clasificar en estos grupos principales:

- **Mecánicos (fresado y molienda):** En este pretratamiento físico, el tamaño de las partículas se reduce, lo que conduce a un aumento en el área superficial y el tamaño de poro, y a una disminución en la cristalinidad y grado de polimerización de la celulosa (60, 61).
- **Biológicos:** Se realiza por acción de microorganismos (bacterias y hongos) o de enzimas, obteniéndose mejoras en el rendimiento respecto a la biomasa sin pretratar, desde 10% a más del 100% (60).

- **Químicos:** Incluye ácidos, álcalis, líquidos iónicos y compuestos oxidantes (62). Se tiene como función primaria remover la hemicelulosa y las ligninas presentes en la biomasa (60).
- **Fisicoquímicos:** Se rompen los enlaces de hidrógeno y se incrementa el área superficial a temperaturas entre 50 - 250 °C como resultado de una explosión de vapor o agua caliente (60, 63).
- **Hidrólisis enzimática:** Es un proceso catalítico donde participan diferentes enzimas, esto genera la ruptura de polímeros de celulosa y hemicelulosa para obtener monómeros como glucosa y xilosa (64, 65). Además, se producen azúcares que son directamente utilizados por todos los microorganismos vivos. Las enzimas más comunes son alfa y beta amilasa (66).

E. Reactor

El tipo de reactor más utilizado es el tipo Bath y son pocos los experimentos efectuados en régimen continuo, esto se debe probablemente a la simple operación y control en el primero (11). Algunos reactores utilizados (67, 68):

- Reactor Anaeróbico de Flujo Ascendente (UASB, por sus siglas en inglés) para tratamiento de aguas residuales, con un rendimiento de 2,45 mol H₂/mol glucosa.
- Reactor de Lecho Fluidizado Anaeróbico (FABR, por sus siglas en inglés) con un rendimiento de 1,01 mol H₂/g DQO.
- Reactor de Placa Plana (FPPBR, por sus siglas en inglés) con un rendimiento de 4,44 mol H₂/ mol glucosa.
- Reactor de Tanque Agitado Continuo (CSTR, por sus siglas en inglés) con un rendimiento de 1,32 ± 0,16 mol H₂/mol hexosa.
- Reactor de Lecho Fluidizado (FBR, por sus siglas en inglés), con un rendimiento de 1 mol H₂/mol xilosa.

La cinética de la reacción de fermentación oscura para producir hidrógeno es un proceso gradual y altamente dependiente de la actividad microbiana y está influenciada por varios factores, como la concentración de sustrato, la temperatura, el pH, la concentración de biomasa

microbiana y la disponibilidad de nutrientes (69).

F. Microorganismos utilizados

Como resultado de muchas investigaciones, se han obtenido resultados importantes acerca del uso de microorganismos capaces de producir hidrógeno molecular como producto metabólico durante su crecimiento. Estos microorganismos son conocidos como bacterias fototróficas o bacterias fermentativas (42, 43). En la Tabla 3 se presentan resultados respecto al rendimiento en la producción de hidrógeno.

Microorganismo	mol H ₂ /mol glucosa
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,1
<i>Enterobacter cloacae</i>	3,3
<i>Escherichia coli</i>	2,0
<i>Clostridium butyricum</i>	2,28
<i>Clostridium pasteurianum</i>	1,19
<i>Clostridium beijerinckii</i>	2,54
<i>Thermotoga neapolitana</i>	3,5
<i>Thermotoga marítima</i>	1,7
<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	2,5
<i>Thermotoga elfii</i>	3,3
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	1,5
<i>Clostridium thermocellum</i>	1,67

Tabla 3. Rendimiento de producción de hidrógeno de algunos microorganismos. Elaboración propia basada en (70, 71).

La obtención de hidrógeno por medio de procesos fermentativos tiene ventajas en comparación con los procesos térmicos, como la gasificación y la termólisis del agua, ya que convierte la biomasa con alto contenido de humedad en hidrógeno; y además, no requieren grandes instalaciones, por lo que puede darse a pequeña escala, y con ello se puede producir hidrógeno todo el día, sin la necesidad de luz y con un consumo bajo de energía, lo que resulta muy rentable (29). Algunos géneros y especies de bacterias han sido muy estudiados y se ha referenciado, especialmente utilizando cultivos con cepas puras de microorganismos, con diferentes sustratos y a condiciones específicas. Por otro lado, también se ha podido aislar microflora de cultivos mixtos de diversas fuentes de desecho, que son menos sensibles a la contaminación de bacterias consumidoras de hidrógeno en comparación con los cultivos puros. Lo anterior se presenta en las Tablas 4 y 5.



Microorganismo	Sustrato	pH	T (°C)	Productividad H ₂ (ml/h)	Rendimiento H ₂ (mol H ₂ /mol sustrato)	Referencia
<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Sacarosa	5,5	37	163	2,78	(72)
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Almidón	8	35	18	194 (ml/g)	(73)
<i>Clostridium saccharoperbutyl acetonicum</i>	Suero de leche	6	30	47,07	2,8	(74)
<i>Clostridium thermoceillum</i> 27405	Fibras de madera	6,9 - 7,1	-	-	1,6	(58)
<i>Clostridium bitiricum</i> , <i>enterobacter aerogenes</i> y <i>rodhocater sp M19</i>	Residuos de almidón de papa	7,5	35	-	7	(75)
<i>E. coli</i>	Glucosa	6,8	30	52	2,4	(76)
<i>E. coli</i>	Glucosa	-	37	-	2	(77)
<i>E. coli</i> MCI3-4	Glucosa	-	37	10	1,27	(78)
<i>Clostridium thermo-lacticum</i>	Medio comercial	7	37	-	0,0574 (mol/g)	(79)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824	Glucosa	-	30	27,2	0,9	(80)

Tabla 4. Procesos por lotes para fermentación oscura usando cultivos puros. Elaboración propia basada en (81).

Sustrato	pH	T (°C)	Productividad H ₂ (ml/h)	Rendimiento H ₂ (mol H ₂ /mol sustrato)	Referencia
Agua residual	7	55	365	-	(10)
Agua residual de procesadoras de alimentos	6	30	275	-	(82)
Glucosa	11,5	37	16,9	-	(83)
Glucosa	6	35	-	1,4	(84)
Glucosa	5,7	35	133,2	-	(85)
Cascarilla de arroz	4,5	37	87,5	-	(86)
Sacarosa	6,7	40	468	1,74	(87)
Sacarosa	6,3 - 8	35	-	5,64	(88)
Sacarosa y desecho de piña	7,5	34	745	2,46	(89)

Tabla 5. Procesos por lotes para fermentación oscura usando algunos cultivos mixtos. Elaboración propia basada en (81).

Otra investigación presenta los efectos del tiempo de retención de sólidos en la producción de hidrógeno, la degradación de la glucosa como sustrato y las bacterias anaerobias en los procesos de tratamiento anaeróbico (90). En este estudio se evidenció que, al aumentar el tiempo de retención, los recuentos de bacterias

anaerobias generales y bacterias formadoras de ácidos grasos volátiles en cada reactor aumentan, mientras que los recuentos del género *Clostridium* y bacterias reductoras de sulfato disminuyen. El contenido de hidrógeno gaseoso también disminuye con el aumento del tiempo de retención de sólidos.

G. Impacto ambiental

El impacto ambiental en los procesos industriales siempre existirá, ya que se utilizan recursos energéticos, o materias primas que se traducen en bienes y servicios (33). Por lo tanto, los procesos de obtención de hidrógeno no son la excepción, y la generación de GEI constituye uno de los principales impactos ambientales asociados con ello.

En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos del cálculo de los GEI para diferentes tecnologías relacionadas con la producción de hidrógeno, utilizando la metodología Análisis de Ciclo de Vida (LCA, por sus siglas en inglés) (91). Allí se puede contrastar la fermentación oscura con otras tecnologías, donde se consideraron las siguientes etapas: extracción y adquisición de materias primas, fabricación, transporte y distribución, uso, mantenimiento y reparación, y fin de vida útil (92, 93).

Tipo de ruta	Tecnología	Valor (gCO ₂ eq/MJ)
Química	Oxidación parcial	102
Química	Gasificación	19 - 242
Química	Reformado con captura de carbono	8
Química	Reformado	20 - 86
Química	Termólisis	1 - 3
Química	Termólisis química	50 - 306
Química	Electrólisis con energía solar	17 - 31
Química	Electrólisis con energía eólica	7 - 21
Bioquímica	Fermentación (foto-fermentación, fermentación oscura o combinación)	28 - 46
Bioquímica	Bioelectrólisis catalizada	44

Tabla 6. Reporte de emisiones de gases de efecto invernadero. Elaboración propia basada en (91).

El impacto ambiental se puede traducir a la denominada huella de carbono, que para el caso de la producción de hidrógeno como vector energético, se ha venido estudiando a lo largo del tiempo (43). Hay diversas tecnologías que se han usado, como el Reformado de Metano con Vapor (SMR_H, por sus siglas en inglés), la Gasificación de Biomasa (BMG_H, por sus siglas en inglés), la Electrólisis de Agua Alcalina (GPE_H, por sus siglas en inglés) con energía de la red eléctrica y

la Electrólisis de Agua Alcalina con energía eólica (WPE_H, por sus siglas en inglés) (43, 94). Para el año 2030 y 2050 las rutas más contaminantes son las de origen fósil y las menos contaminantes son las opciones renovables (WPE_H y BMG_H), con huellas de carbono estables alrededor de cero (95). La Figura 2 muestra el avance de las tecnologías hasta el año 2050 y su impacto traducido a huella de carbono.

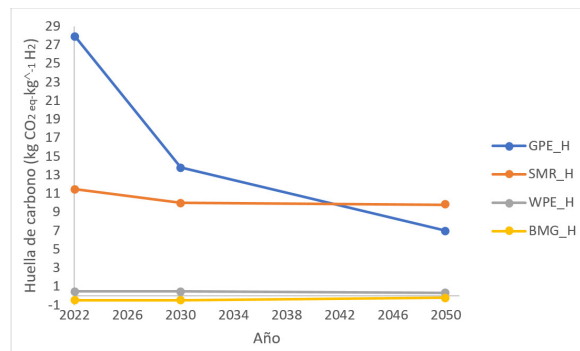


Figura 2. Huella de carbono hasta el año 2050. Elaboración propia basada en (34).

La producción de hidrógeno por fermentación oscura es una vía potencialmente más sostenible en comparación con la producción de hidrógeno a partir de combustibles fósiles, ya que utiliza microorganismos que consumen CO₂ durante el proceso, lo que puede reducir la huella de carbono en comparación con las tecnologías convencionales. Sin embargo, se hace necesario tener en cuenta algunos factores para evaluar adecuadamente la huella de carbono tales como consumo de carbono, emisiones de gases de efecto invernadero, eficiencia del proceso y energía utilizada.

H. Papel de la Ingeniería Química

A lo largo de los últimos años, con el aumento del uso del petróleo y el gas natural, el ingeniero químico encaminó la evolución de estas materias primas con el fin de producir bienes y servicios que son esenciales para la vida de los seres humanos hoy en día, tal como la urea, la gasolina, el diésel y una larga lista de plásticos y polímeros (35). Sin embargo, queda la pregunta de cómo abordará los desafíos impuestos por los recursos renovables, la obtención de los productos químicos y el suministro de energía.

Los ingenieros químicos encontraron un gran atractivo en el uso de la herramienta LCA. Los aspectos del ejercicio LCA, como la construcción de diagramas de flujo de proceso,



el establecimiento de límites del sistema, la definición de una unidad funcional y el equilibrio de masa y energía, son todos muy familiares para el ingeniero químico. Con esto, se ha trabajado en el desarrollo de nuevos combustibles como el hidrógeno, por medio de diferentes métodos, como la fermentación oscura por ejemplo, aportando en aspectos tan importantes como el diseño de reactores o de plantas químicas, el control de parámetros de proceso, la optimización del medio de cultivo, la evaluación de la cinética de reacción, y la recuperación y purificación del hidrógeno (93, 96).

Desde la Ingeniería Química se ha venido trabajando para dar solución a los graves problemas ambientales que existen hoy en día. Por ejemplo, el ingeniero James A. Trainham y sus colegas plantean el uso de combustibles solares para generar hidrógeno, comparando cuatro rutas prometedoras, fotoelectroquímica, termoquímica, electrólisis/térmica y gasificación de biomasa, todas impulsadas por energía solar (97). También se ha estudiado el diseño de biorreactores para la producción de hidrógeno, específicamente por medio de la fermentación oscura, a partir de residuos agroindustrial (98, 99).

Por otra parte, se tienen importantes desafíos y oportunidades en el campo de la biología sintética en rápido crecimiento, donde es imprescindible el rol que los ingenieros químicos pueden desempeñar en su avance. La biología sintética brinda numerosas y excelentes oportunidades para los ingenieros químicos, en el desarrollo de nuevos procesos para la producción a gran escala de biocombustibles, productos químicos de valor agregado y terapias de proteínas. Sin embargo, abundan los desafíos en todas las escalas. En particular, la modularización y estandarización de los componentes de un sistema biológico, siguen siendo el mayor obstáculo de la biología sintética (100).

En general, la industria química ha progresado en el tratamiento de las preocupaciones ambientales. El desarrollo de la química verde y su implementación tanto en la academia como en la industria ha promovido una mentalidad más sostenible en los ingenieros químicos (96). La aplicación de los principios de la química verde en la producción de hidrógeno es fundamental para avanzar hacia una economía sostenible y con menor impacto ambiental, con menores

emisiones de GEI, valorización de subproductos, y generación y almacenamiento de energía renovable.

En conjunto, los aportes de la Ingeniería Química en la fermentación oscura ayudan a mejorar la eficiencia y la sostenibilidad de este proceso de producción de hidrógeno, lo que favorece su aplicación como un vector energético limpio y renovable en el futuro.

IV. CONCLUSIONES

- Las investigaciones relacionadas con la producción de hidrógeno por diferentes medios, como la fermentación oscura, proponen al hidrógeno como una alternativa de biocombustible para mitigar los efectos del cambio climático.
- La revisión revela que el uso de biomasa lignocelulósica, como bagazo de caña de azúcar, paja de trigo, paja de arroz, rastrojo de maíz, pulpa de zanahoria, etc., es una excelente fuente de carbono fermentable para producir biohidrógeno con altos rendimientos.
- Mediante el método de fermentación oscura, los géneros bacterianos *Enterobacter*, *Bacillus* y *Clostridium*, dadas sus características fisicoquímicas, generan unos rendimientos aproximadamente de 2 mol H₂/mol glucosa.
- Las condiciones de operación más sensibles de controlar en el proceso de producción de hidrógeno fermentativo son pH, inóculo, sustrato, tipo de reactor, nutrientes y temperatura. Si alguno de estos parámetros se altera repentinamente, se puede disminuir drásticamente el rendimiento (mol H₂/mol glucosa), ya que pueden verse alteradas las rutas metabólicas utilizadas.
- Una de las limitantes para el uso de la fermentación oscura en la obtención de hidrógeno es su velocidad y volumen de producción, que suelen ser muy reducidos en comparación con la producción de hidrógeno a partir de otras tecnologías renovables.
- El proceso de fermentación oscura puede generar hidrógeno de manera eficiente y con una menor huella de carbono en comparación con los métodos tradicionales

basados en combustibles fósiles, con 28 - 46 g CO₂eq/MJ, y se convierte en una alternativa prometedora en la búsqueda de fuentes de energía más limpias y sostenibles.

- En América Latina se debe promover el desarrollo de más investigaciones respecto a la obtención de hidrógeno a partir de biomasa, una materia prima abundante en el entorno, para así propiciar una mayor diversidad de fuentes energéticas.

V. AGRADECIMIENTOS

Al Grupo de Investigación en Procesos de Separación no Convencionales (GPS) adscrito a la Universidad de América y al Semillero de Investigación SimPro_GPS de la Facultad de Ingeniería.

VI. REFERENCIAS

1. Claassen, P. A., & De Vrije, T. Non-thermal production of pure hydrogen from biomass: HYVOLUTION. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2006; 31(11): 1416-1423.
2. Romero, M. G. Biocombustibles y producción de biohidrógeno. *MoleQla: revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*. 2020; (38): 8.
3. Jahanger, A., Ozturk, I., Onwe, J. C., Joseph, T. E., & Hossain, M. R. Do technology and renewable energy contribute to energy efficiency and carbon neutrality? Evidence from top ten manufacturing countries. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*. 2023; 56: 103084.
4. Parmesan, C., Morecroft, M. D., & Trisurat, Y. *Climate change 2022: Impacts, adaptation and vulnerability (Doctoral dissertation, GIEC)*. 2022.
5. Ueckerdt, F., Verpoort, P., Anantharaman, R., Bauer, C., Beck, F., Longden, T., & Roussanaly, S. On the cost competitiveness of blue and green hydrogen. Available at SSRN 4501786. 2023.
6. Sinha, P., & Pandey, A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2011; 36(13): 7460-7478.
7. Castiblanco, O., & Cárdenas, D. J. Producción de hidrógeno y su perspectiva en Colombia: una revisión. *Gestión y Ambiente*. 2020; 23(2): 299-311.
8. Ananthi, V., Ramesh, U., Balaji, P., Kumar, P., Govarthanan, M., & Arun, A. A review on the impact of various factors on biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2022.
9. Liu, X., Zhu, Y., & Yang, S. T. Butyric acid and hydrogen production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 and mutants. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 38(3-4): 521-528.
10. Zhang, T., Liu, H., & Fang, H. H. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *Journal of environmental management*. 2003; 69(2): 149-156.
11. Londoño, S. A. B., & Chaparro, T. R. Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura: una revisión crítica (1993-2011). *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*. 2012; 20(3): 398-411.
12. Mohanakrishna, G., Sneha, N. P., Rafi, S. M., & Sarkar, O. Dark fermentative hydrogen production: Potential of food waste as future energy needs. *Science of The Total Environment*. 2023; 888: 163801.
13. Pasquevich, D. Tecnología del hidrógeno. *Petrotecnia*. 2004; 1: 55.
14. Martínez-Barrera, G., Martínez-López, M., & Téllez-López, A. Hidrógeno: tecnologías de producción, almacenamiento y aplicaciones. *Consejo Ejecutivo*, 100. 2022.
15. Taherian, Z., Khataee, A., Han, N., & Orooji, Y. Hydrogen production through methane reforming processes using promoted-Ni/mesoporous silica: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2022; 107: 20-30.
16. Kumar, S. S., & Lim, H. An overview of water electrolysis technologies for green hydrogen production. *Energy reports*. 2022; 8: 13793-13813.



17. Vidas, L., & Castro, R. Recent developments on hydrogen production technologies: state-of-the-art review with a focus on green-electrolysis. *Applied Sciences*. 2021; 11(23): 11363.
18. Ahmad Kamaroddin, M. F., Sabli, N., Tuan Abdullah, T. A., Siajam, S. I., Abdullah, L. C., Abdul Jalil, A., & Ahmad, A. Membrane-based electrolysis for hydrogen production: A review. *Membranes*. 2021; 11(11): 810.
19. Díez, E. G. Reformado de combustibles líquidos con captura de co2 mediante transportadores sólidos de oxígeno (Doctoral dissertation, Universidad de Zaragoza). 2017.
20. Klug, M. Pirólisis, un proceso para derretir la biomasa. *Revista de Química*. 2012; 26(1-2): 37-40.
21. Lopez, G., Santamaria, L., Lemonidou, A., Zhang, S., Wu, C., Sipra, A. T., & Gao, N. Hydrogen generation from biomass by pyrolysis. *Nature Reviews Methods Primers*. 2022; 2(1): 20.
22. Domenech, P. Tecnologías de producción de hidrógeno basadas en métodos biológicos (No. 1481). CIEMAT technical reports. 2020.
23. Drapcho, C. M., Nhuan, N. P., & Walker, T. H. *Biofuels engineering process technology* (No. Sirsi) i9780071487498). New York: McGraw-Hill. 2008.
24. Yu, J., & Takahashi, P. Biophotolysis-based hydrogen production by cyanobacteria and green microalgae. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*. 2007; 1: 79-89.
25. Ghiasian, M. Biophotolysis-based hydrogen production by cyanobacteria. *Prospects of renewable bioprocessing in future energy systems*. 2019: 161-184.
26. Lu, L., & Ren, Z. J. Microbial electrolysis cells for waste biorefinery: A state of the art review. *Bioresource technology*. 2016; 215: 254-264.
27. Hua, T., Li, S., Li, F., Zhou, Q., & Ondon, B. S. Microbial electrolysis cell as an emerging versatile technology: a review on its potential application, advance and challenge. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2019; 94(6): 1697-1711.
28. Fernández Rodríguez, C., Martínez Torres, E. J., Morán Palao, A., & Gómez Barrios, X. Procesos biológicos para el tratamiento de lactosuero con producción de biogás e hidrógeno. *Revisión bibliográfica. Revista Ion*. 2016; 29(1): 47-62.
29. De Vrije, T., & Claassen, P. A. M. Dark hydrogen fermentations. *Bio-methane & Bio-hydrogen*. 2003; 103-123.
30. Fang, Z., Smith, R. L., & Qi, X. (Eds.). *Production of hydrogen from renewable resources* (Vol. 5). Dordrecht: Springer. 2015.
31. Adams, M. W., Mortenson, L. E., & Chen, J. S. Hydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics*. 1980; 594(2-3): 105-176.
32. Thauer, R. K., Jungermann, K., & Decker, K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological reviews*. 1977; 41(1): 100-180.
33. Álvarez-Delgado, A., Otero-Rambla, M. A., & Faife-Pérez, E. Impacto ambiental de la producción de agro-combustibles. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 2011; 45(2): 19-27.
34. Wang, J., & Wan, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. *International journal of hydrogen energy*. 2009; 34(2): 799-811.
35. Agrawal, R., & Sikdar, S. K. Energy, environment and sustainability challenges and opportunities for chemical engineers. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 2012; 3(1): 201-203.
36. Lin, C. Y., Chang, C. C., & Hung, C. H. (2008). Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures. *International journal of hydrogen energy*, 33(10), 2445-2453.
37. Sarangi, P. K., & Nanda, S. Biohydrogen production through dark fermentation. *Chemical Engineering & Technology*. 2020; 43(4): 601-612.
38. Levin, D. B., Carere, C. R., Cicek, N., & Sparling, R. Challenges for biohydrogen production via direct lignocellulose fermentation. *International journal of hydrogen energy*. 2009; 34(17): 7390-7403.
39. Soares, J. F., Confortin, T. C., Toderó, I., Mayer, F. D., & Mazutti, M. A. Dark fermentative biohydrogen

- production from lignocellulosic biomass: technological challenges and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2020; 117: 109484.
40. VanFossen, A. L., Verhaart, M. R., Kengen, S. M., & Kelly, R. M. Carbohydrate utilization patterns for the extremely thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* reveal broad growth substrate preferences. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009; 75(24): 7718-7724.
 41. De Vrije, T., Bakker, R. R., Budde, M. A., Lai, M. H., Mars, A. E., & Claassen, P. A. Efficient hydrogen production from the lignocellulosic energy crop *Miscanthus* by the extreme thermophilic bacteria *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*. *Biotechnology for biofuels*. 2009; 2(1): 1-15.
 42. Levin, D. B., Pitt, L., & Love, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International journal of hydrogen energy*. 2004; 29(2): 173-185.
 43. Valente, A., Iribarren, D., & Dufour, J. Prospective carbon footprint comparison of hydrogen options. *Science of The Total Environment*. 2020; 728: 138212.
 44. Ginkel, S. V., Sung, S., & Lay, J. J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental science & technology*. 2001; 35(24): 4726-4730.
 45. Bielen, A. A., Verhaart, M. R., VanFossen, A. L., Blumer-Schuetz, S. E., Stams, A. J., van der Oost, J., ... & Kengen, S. W. A thermophile under pressure: Transcriptional analysis of the response of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* to different H₂ partial pressures. *International journal of hydrogen energy*. 2013; 38(4): 1837-1849.
 46. Chen, W. H., Chen, S. Y., Khanal, S. K., & Sung, S. Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2006; 31(15): 2170-2178.
 47. Pérez-Rangel, M., Barboza-Corona, J. E., Buitrón, G., & Valdez-Vazquez, I. Essential nutrients for improving the direct processing of raw lignocellulosic substrates through the dark fermentation process. *BioEnergy research*. 2020; 13: 349-357.
 48. Wang, J., & Yin, Y. *Clostridium* species for fermentative hydrogen production: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2021; 46(70): 34599-34625..
 49. Moussa, R. N., Moussa, N., & Dionisi, D. Hydrogen production from biomass and organic waste using dark fermentation: an analysis of literature data on the effect of operating parameters on process performance. *Processes*. 2022; 10(1): 156.
 50. D'Silva, T. C., Khan, S. A., Kumar, S., Kumar, D., Isha, A., Deb, S., ... & Semple, K. T. Biohydrogen production through dark fermentation from waste biomass: Current status and future perspectives on biorefinery development. *Fuel*. 2023; 350: 128842.
 51. Urbaniec, K., & Bakker, R. R. Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation—A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2015; 40(9): 3648-3658.
 52. Panagiotopoulos, I. A., Bakker, R. R., De Vrije, T., Koukios, E. G., & Claassen, P. A. M. Pretreatment of sweet sorghum bagasse for hydrogen production by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2010; 35(15): 7738-7747.
 53. Patra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M., & Reungsang, A. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. *International journal of hydrogen energy*. 2008; 33(19): 5256-5265.
 54. Eriksen, N. T., Riis, M. L., Holm, N. K., & Iversen, N. H₂ synthesis from pentoses and biomass in *Thermotoga* spp. *Biotechnology letters*. 2011; 33: 293-300.
 55. Lo, Y. C., Lu, W. C., Chen, C. Y., & Chang, J. S. Dark fermentative hydrogen production from enzymatic hydrolysate of xylan and pretreated rice straw by *Clostridium butyricum* CGS5. *Bioresource technology*. 2010; 101(15): 5885-5891.
 56. Datar, R., Huang, J., Maness, P. C., Mohagheghi, A., Czernik, S., & Chornet, E. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2007; 32(8): 932-939.
 57. De Vrije, T., Budde, M. A., Lips, S. J., Bakker, R. R., Mars, A. E., & Claassen, P. A. Hydrogen production



- from carrot pulp by the extreme thermophiles *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2010; 35(24): 13206-13213.
58. Levin, D. B., Islam, R., Cicek, N., & Sparling, R. Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2006; 31(11): 1496-1503.
 59. Kádár, Z., de Vrije, T., van Noorden, G. E., Budde, M. A., Szengyel, Z., Réczey, K., & Claassen, P. A. Yields from glucose, xylose, and paper sludge hydrolysate during hydrogen production by the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. In *Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003*, in Breckenridge, CO (pp. 497-508). Humana Press. 2004.
 60. Espinosa Negrín, A. M., López González, L. M., & Casdelo Gutiérrez, N. L. Pretratamiento de Biomásas Lignocelulósicas: Breve Revisión de los Principales Métodos Utilizados. *Centro Azúcar*. 2021; 48(3): 108-119.
 61. Gorozabel, B. P. L., Reyes, E. R., & Parra, J. C. P. Transformación de Biomasa Lignocelulósica en Biocombustible de Segunda Generación: Estado del Arte del Pretratamiento. *Revista Bases de la Ciencia*. 2022; 7(ESPECIAL): 3-22.
 62. Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*. 2009; 100(1): 10-18.
 63. Wi, S. G., Cho, E. J., Lee, D. S., Lee, S. J., Lee, Y. J., & Bae, H. J. Lignocellulose conversion for biofuel: a new pretreatment greatly improves downstream biocatalytic hydrolysis of various lignocellulosic materials. *Biotechnology for biofuels*. 2015; 8(1): 1-11.
 64. Mohammad, J. T., & Keikhosro, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A Review. *Bio Resources*. 2007; 2(4): 707-738.
 65. Arismendy, A. M., Villa Retrepo, A. F., Alcaraz, W., Chamorro, E. R., & Area, M. C. (Optimización de la hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz. *Revista de Ciencia y Tecnología*. 2019; (32): 1-10.
 66. Bustos, C. R. B., Morales, D., Cuellar, L., & Jaramillo, S. Hidrólisis enzimática de almidón. *Revista de Investigación*. 2017; 10(1): 129-140.
 67. Vásquez Flores, D. Producción de hidrógeno mediante fermentación oscura. *Revisión sistemática*, 2020. 2020.
 68. Castelló, E., Ferraz-Junior, A. D. N., Andreani, C., del Pilar Anzola-Rojas, M., Borzacconi, L., Buitrón, G., ... & Etchebere, C. Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: possible causes and solutions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2020; 119: 109602.
 69. Boshagh, F., Rostami, K., & van Niel, E. W. Application of kinetic models in dark fermentative hydrogen production—A critical review. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2022; 47(52): 21952-21968.
 70. Gopalakrishnan, B., Khanna, N., & Das, D. Dark-fermentative biohydrogen production. In *Biohydrogen* (pp. 79-122). Elsevier. 2019.
 71. Dias, P., Moura, P., & de Carvalho, C. Hydrogen production by *Clostridium butyricum*: improving production yields and assessing changes in the cell lipid profile during adaptation to furans and gallic acid.
 72. Liu, G., & Shen, J. Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2004; 98(4): 251-256.
 73. Chen, W. M., Tseng, Z. J., Lee, K. S., & Chang, J. S. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International journal of hydrogen energy*. 2005; 30(10): 1063-1070.
 74. Yokoi, H., Saito, A., Uchida, H., Hirose, J. U. N., Hayashi, S., & Takasaki, Y. Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2001; 91(1): 58-63.
 75. Ishikawa, M., Yamamura, S., Takamura, Y., Sode, K., Tamiya, E., & Tomiyama, M. Development of a

- compact high-density microbial hydrogen reactor for portable bio-fuel cell system. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2006; 31(11): 1484-1489.
76. Bisailon, A., Turcot, J., & Hallenbeck, P. C. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2006; 31(11): 1504-1508.
 77. Aki, H., Yamamoto, S., Kondoh, J., Maeda, T., Yamaguchi, H., Murata, A., & Ishii, I. Fuel cells and energy networks of electricity, heat, and hydrogen in residential areas. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2006; 31(8): 967-980.
 78. Redwood, M. D., & Macaskie, L. E. A two-stage, two-organism process for biohydrogen from glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2006; 31(11): 1514-1521.
 79. Collet, C., Adler, N., Schwitzguébel, J. P., & Péringer, P. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2004; 29(14): 1479-1485.
 80. Zhang, Z. P., Show, K. Y., Tay, J. H., Liang, D. T., Lee, D. J., & Jiang, W. J. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochemistry*. 2006; 41(10): 2118-2123.
 81. Bedoya, A., Castrillón, J. C., Ramírez, J. E., Vásquez, J. E., & Arias Zabala, M. Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. *Dyna*. 2008; 75(154): 137-157.
 82. Kawagoshi, Y., Hino, N., Fujimoto, A., Nakao, M., Fujita, Y., Sugimura, S., & Furukawa, K. Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005; 100(5): 524-530.
 83. Cai, M., Liu, J., & Wei, Y. Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment. *Environmental science & technology*. 2004; 38(11): 3195-3202.
 84. Oh, Y. K., Seol, E. H., Kim, J. R., & Park, S. Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2003; 28(12): 1353-1359.
 85. Cheong, D. Y., & Hansen, C. L. Acidogenesis characteristics of natural, mixed anaerobes converting carbohydrate-rich synthetic wastewater to hydrogen. *Process Biochemistry*. 2006; 41(8): 1736-1745.
 86. Zhu, H., & Béland, M. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2006; 31(14): 1980-1988.
 87. Chen, X., Sun, Y., Xiu, Z., Li, X., & Zhang, D. Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2006; 31(4): 539-549.
 88. Hussy, I., Hawkes, F. R., Dinsdale, R., & Hawkes, D. L. Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2005; 30(5): 471-483.
 89. Asada, Y., Tokumoto, M., Aihara, Y., Oku, M., Ishimi, K., Wakayama, T., ... & Kohno, H. Hydrogen production by co-cultures of *Lactobacillus* and a photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2006; 31(11): 1509-1513.
 90. Nakamura, M., Kanbe, H., & Matsumoto, J. I. Fundamental studies on hydrogen production in the acid-forming phase and its bacteria in anaerobic treatment processes—the effects of solids retention time. *Water Science and Technology*. 1993; 28(7): 81-88.
 91. Cardona-Alzate, C. A. Análisis del ciclo de vida para la producción de hidrógeno como combustible del futuro. *Revista Cubana de Química*. 2013; 25(2): 165-179.
 92. Drapcho, C. M., Nhuan, N. P., & Walker, T. H. *Biofuels engineering process technology (No. Siri) i9780071487498*. New York: McGraw-Hill. 2008.
 93. Morya, R., Raj, T., Lee, Y., Pandey, A. K., Kumar, D., Singhania, R. R., ... & Kim, S. H. Recent updates in biohydrogen production strategies and life-cycle assessment for sustainable future. *Bioresource technology*. 2022; 128159.



94. Hren, R., Vujanović, A., Van Fan, Y., Klemeš, J. J., Krajnc, D., & Čuček, L. Hydrogen production, storage and transport for renewable energy and chemicals: An environmental footprint assessment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2023; 173: 113113.
95. Rojas, J., Zhai, S., Sun, E., Haribal, V., Marin-Quiros, S., Sarkar, A., ... & Majumdar, A. Technoeconomics and carbon footprint of hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2023.
96. Provo, J., Fava, J., & Baer, S. Life Cycle Assessment and the chemical engineer: a marriage of convenience. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 2013; 2(3): 278-281.
97. Trainham, J. A., Newman, J., Bonino, C. A., Hoertz, P. G., & Akunuri, N. Whither solar fuels?. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 2012; 1(3): 204-210.
98. Cadena Martínez, D. L., & Córdoba España, W. A. Propuesta para la obtención de biohidrógeno por fermentación oscura a partir de un residuo agroindustrial (Bachelor's thesis, Fundación Universidad de América). 2022.
99. Qyyum, M. A., Ihsanullah, I., Ahmad, R., Ismail, S., Khan, A., Nizami, A. S., & Tawfik, A. Biohydrogen production from real industrial wastewater: Potential bioreactors, challenges in commercialization and future directions. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2022; 47(88): 37154-37170.
100. Luo, Y., Lee, J. K., & Zhao, H. Challenges and opportunities in synthetic biology for chemical engineers. *Chemical engineering science*. 2013; 103: 115-119.