



I I B I O



## Tesis de Grado

**Producción de hidrógeno biológico mediante fermentaciones anaeróbicas de un consorcio microbiano a partir de hidrolizados lignocelulósicos**

**Valentino Mórtola**

**Director: Dr. Diego Gabriel Nosedá**

**Co-Director: Lic. Rodrigo Enrique García**

**Instituto de Investigaciones Biotecnológicas**

**Universidad Nacional de San Martín**

**2024**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que contribuyeron de manera significativa a la realización de este trabajo de investigación y a mi formación universitaria de grado en general.

En primer lugar, deseo agradecer a mi familia por brindarme la oportunidad de estudiar la carrera que elegí en la UNSAM, a pesar de que la misma se encontrara a 800 km de distancia de Bella Vista, Corrientes, mi ciudad natal.

Por supuesto, deseo expresar mi agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Diego G. Nosedá, por su orientación experta, apoyo constante y dedicación durante todo el proceso de esta tesis. Sus valiosas sugerencias, conocimientos y motivación fueron fundamentales para llevar a cabo este trabajo.

Agradezco al Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIBio) por brindarme el apoyo, instalaciones y equipamiento necesario para el desarrollo de este trabajo de tesis.

También quiero agradecer al Lic. Rodrigo García, mi co-director, y a la Dra. María José Lavorante por su colaboración y por abrirnos las puertas del Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas para la Defensa (CITEDEF). Sus aportes enriquecieron considerablemente el contenido y la calidad de esta tesis, y nos permitieron utilizar su biorreactor adaptado para las fermentaciones que se llevaron a cabo en este trabajo.

Asimismo, agradezco a mis compañeros de laboratorio, Jonathan, Ailín, Juan y Ever, por su valiosa ayuda tanto en el trabajo de laboratorio como en el proceso de escritura de la tesis.

Doy las gracias a mis compañeros de cursada, en especial a Manuel Da Ponte y Charo Molina, cuya presencia hizo la carrera más llevadera y divertida. Además, agradezco a Mechi, Mayra, Maxi, Migue, Mila y Joel, entre otros excelentes compañeros, por brindarme su amistad; las risas no faltaron.

También quiero expresar mi agradecimiento a la directora de la carrera, la Dra. Susana Giambiagi, por brindarme asistencia cuando lo necesité a lo largo de mis estudios universitarios.

Además, quiero agradecer al gobernador de la provincia de Corrientes, el Dr. Gustavo Valdés, por confiar en mí para poner en marcha el proyecto de Caá Cannabis y, a su vez, permitirme el tiempo necesario para finalizar mis estudios universitarios.

Por último, pero no menos importante, agradezco a la Universidad Nacional de San Martín por brindarme acceso a una educación pública de calidad, lo que sin duda es una de sus marcas distintivas. Me llena de orgullo ser parte de la comunidad #UNSAMER.

A todos ustedes, les estoy profundamente agradecido.

Valentino Mórtola.

## RESUMEN

El suministro mundial de energía depende principalmente de combustibles fósiles, sin embargo, se están llevando a cabo esfuerzos para utilizar fuentes de energía renovables menos contaminantes. En este sentido, el hidrógeno se destaca como una fuente de energía prometedora, debido a su combustión limpia y eficiente por medio de pilas de combustible (Das & Veziroğlu, 2001). Sin embargo, actualmente la mayor parte del hidrógeno se produce a partir de combustibles fósiles, liberando gases de efecto invernadero a la atmósfera (Łukajtis *et al.*, 2018). Para abordar esta problemática, se está optimizando la producción de hidrógeno biológico a partir del metabolismo bacteriano, especialmente del género *Clostridium spp.* (Wang & Yin, 2019). El principal desafío de esta metodología de producción de hidrógeno es su alto costo, por lo que se necesitan estrategias para hacerla económicamente viable, como la utilización de materias primas renovables y de bajo costo, como los materiales lignocelulósicos.

En este trabajo de tesis de grado se llevó a cabo la optimización de la producción de hidrógeno biológico mediante fermentación anaeróbica de un consorcio microbiano proveniente de un biodigestor, utilizando como medios de cultivo hidrolizados lignocelulósicos obtenidos mediante hidrólisis ácida de biomasa lignocelulósica. Para tal fin, se realizó un análisis de aptitud de los siguientes sustratos lignocelulósicos en pos de seleccionar al más adecuado para la obtención de los hidrolizados: cáscara de maní, cáscara de mandioca, bagazo de cervecería, hojas de maíz, cáscara de arroz, residuo de jjoba, residuos de poda municipal, de pino y de eucalipto. Para este análisis, se elaboró un sistema de puntajes considerando los siguientes criterios: concentración de nutrientes e inhibidores microbianos en los hidrolizados lignocelulósicos, disponibilidad, y facilidad de almacenamiento y transporte de los sustratos lignocelulósicos. La cáscara de arroz fue el sustrato que mayor puntaje alcanzó a partir de este análisis de aptitud entre todos los sustratos lignocelulósicos evaluados.

Posteriormente, se ensayó la adaptación del consorcio microbiano al medio de cultivo definido de Logan mediante pasajes sucesivos y se evaluó la producción de hidrógeno a partir de cultivos del consorcio microbiano proveniente de los repiques en comparación con cultivos del consorcio original. Se observó que los repiques sucesivos del consorcio microbiano pueden conducir a la pérdida de la capacidad de producción de hidrógeno, posiblemente debido a la eliminación de ciertas cepas bacterianas necesaria para tal fin.

Asimismo, se evaluó el crecimiento del consorcio microbiano en frascos *Erlenmeyer* con medio definido de Logan conteniendo distintas fuentes de carbono: glucosa, xilosa y una mezcla de ambos azúcares, determinando que el consorcio bacteriano puede utilizar tanto glucosa como xilosa como fuentes de carbono, aunque presenta preferencia por la glucosa.

Además, se ensayó el crecimiento del consorcio microbiano en frascos *Erlenmeyer* con distintas concentraciones de hidrolizados de cáscara de arroz en medio definido de Logan: 25 %, 50 %, 75 % y 100 % (v/v), verificando crecimiento del consorcio únicamente con 25 % (v/v) de hidrolizado. Por este motivo,

seguidamente, se llevó a cabo la detoxificación de los hidrolizados mediante sobrealcalinización (*overliming*) y posterior tratamiento con carbón activado, disminuyendo así la concentración de compuestos tóxicos o inhibidores. Luego, se evaluó la producción de hidrógeno mediante cultivos en frascos *Erlenmeyer* con distintas concentraciones de hidrolizado detoxificado, determinado que el mayor rendimiento de producción de H<sub>2</sub> se consiguió con 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado (2,58 mg H<sub>2</sub>/g azúcares reductores), en comparación con los cultivos control en medio definido de Logan (0,32 mg H<sub>2</sub>/g azúcares reductores).

Finalmente, se llevó a cabo el crecimiento y producción de hidrógeno mediante fermentaciones del consorcio microbiano en un biorreactor de tanque agitado de 5 L con 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado y con medio definido de Logan (control). De este modo, con 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado se logró alcanzar una productividad volumétrica de 1,4 mg H<sub>2</sub>/L h y un rendimiento de 8,0 mg H<sub>2</sub>/g azúcares reductores a las 72 h de proceso, en comparación con el medio definido de Logan con el que se obtuvo una productividad volumétrica de 0,7 mg H<sub>2</sub>/L h y un rendimiento de 3,9 mg H<sub>2</sub>/g azúcares reductores.

De esta manera se consiguió optimizar la producción de hidrógeno mediante cultivos en frascos *Erlenmeyer* y fermentaciones anaeróbicas en biorreactor de tanque agitado con un consorcio microbiano proveniente de un biodigestor y utilizando hidrolizados detoxificados de cáscara de arroz.

**Palabras clave:** Hidrógeno, sustratos lignocelulósicos, consorcio microbiano, biorreactor.

## ABSTRACT

The global energy supply relies primarily on fossil fuels; however, efforts are being made to utilize less polluting renewable energy sources. In this regard, hydrogen stands out as a promising energy source due to its clean and efficient combustion through fuel cells (Das & Veziroğlu, 2001). However, currently, most of the hydrogen is produced from fossil fuels, releasing greenhouse gases into the atmosphere (Łukajtis et al., 2018). To address this issue, efforts are being made to optimize biological hydrogen production through bacterial metabolism, especially from the *Clostridium spp.* genus (Wang & Yin, 2019). The main challenge of this hydrogen production methodology is its high cost, thus strategies are needed to make it economically viable, such as the use of renewable and low-cost raw materials, like lignocellulosic materials.

In this thesis work, the optimization of biological hydrogen production was carried out through anaerobic fermentation of a microbial consortium from a biodigester, using lignocellulosic hydrolysates obtained by acidic hydrolysis of lignocellulosic biomass. For this purpose, an aptitude analysis of the following substrates was performed to select the most suitable for obtaining hydrolysates: peanut shell, cassava peel, brewery spent grain, corn leave, rice husk, jojoba residue, urban pruning residues, pine, and eucalyptus residues. For this analysis, a scoring system was developed considering the following criteria: concentration of nutrients and microbial inhibitors in lignocellulosic hydrolysates, availability, and ease of storage and transport of lignocellulosic substrates. Rice husk was the substrate that scored the highest from this aptitude analysis among all evaluated lignocellulosic substrates.

Subsequently, the adaptation of the microbial consortium to the defined Logan's medium was tested through successive passages, and hydrogen production from cultures of the microbial consortium from subcultures was evaluated compared to cultures of the original consortium. It was observed that successive subcultures of the microbial consortium may lead to a loss of hydrogen production capacity, possibly due to the elimination of certain bacterial strains necessary for this purpose.

Additionally, the growth of the microbial consortium was evaluated in *Erlenmeyer* flasks with defined Logan's medium containing different carbon sources: glucose, xylose, and a mixture of both sugars, determining that the bacterial consortium can utilize both glucose and xylose as carbon sources, although it shows a preference for glucose.

Furthermore, the growth of the microbial consortium was evaluated in *Erlenmeyer* flasks with different concentrations of rice husk hydrolysates in defined Logan's medium: 25 %, 50 %, 75 %, and 100 % (v/v), verifying consortium growth only with 25 % (v/v) hydrolysate. For this reason, detoxification of hydrolysates was subsequently carried out by overliming and subsequent treatment with activated charcoal, thus reducing the concentration of toxic or inhibitory compounds. Then, hydrogen production was evaluated through cultures in *Erlenmeyer* flasks with different concentrations of detoxified hydrolysate, determining that the highest H<sub>2</sub> production yield was achieved with 75 % and 100 % (v/v) detoxified hydrolysate (2.58 mg

H<sub>2</sub>/g reducing sugars), compared to control cultures in defined Logan's medium (0.32 mg H<sub>2</sub>/g reducing sugars).

Finally, the growth and hydrogen production were carried out through fermentations of the microbial consortium in a 5 L stirred-tank bioreactor with 100 % (v/v) detoxified hydrolysate and with defined Logan's medium (control). Thus, with 100 % (v/v) detoxified hydrolysate, a volumetric productivity of 1.4 mg H<sub>2</sub>/L h and a yield of 8.0 mg H<sub>2</sub>/g reducing sugars were achieved at 72 h of process, compared to defined Logan's medium, which resulted in a volumetric productivity of 0.7 mg H<sub>2</sub>/L h and a yield of 3.9 mg H<sub>2</sub>/g reducing sugars.

In this way, the optimization of hydrogen production was achieved through cultures in *Erlenmeyer* flasks and anaerobic fermentations in a stirred-tank bioreactor with a microbial consortium from a biodigester and using detoxified rice husk hydrolysates.

**Keywords:** Hydrogen, lignocellulosic substrates, microbial consortium, bioreactor.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	8
1.1. Aspectos generales.....	8
1.2. Hidrógeno como combustible.....	9
1.3. Análisis tecno-económico .....	10
1.4. Hidrógeno biológico .....	12
1.5. Consorcios microbianos .....	13
1.6. Metabolismo de <i>Clostridium spp.</i> .....	15
1.7. Celdas de combustible .....	18
1.8. Sustratos lignocelulósicos .....	19
1.9. Pretratamiento de los sustratos lignocelulósicos .....	22
1.10. Inhibidores microbianos.....	25
1.11. Métodos de detoxificación de inhibidores microbianos .....	26
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	28
2.1. Hipótesis.....	28
2.2. Objetivos .....	28
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29
3.1. Métodos analíticos de cuantificación .....	29
3.1.1. Método de cuantificación de glucosa .....	29
3.1.2. Método de cuantificación de azúcares reductores.....	30
3.1.3. Método de cuantificación de pentosas y furfurales.....	31
3.1.4. Método de cuantificación de fenoles.....	33
3.2. Ensayo de linealidad de los métodos analíticos.....	34
3.3. Sustratos lignocelulósicos y consorcio microbiano.....	35
3.4. Hidrólisis química de sustratos lignocelulósicos .....	35
3.5. Análisis de aptitud de sustratos lignocelulósicos para la producción de biohidrógeno.....	36
3.6. Adaptación del consorcio microbiano a un medio definido mediante pasajes sucesivos .....	40
3.7. Producción de biohidrógeno con el consorcio microbiano original y el proveniente de repiques.....	40
3.8. Evaluación de crecimiento del consorcio microbiano en medio definido con distintas fuentes de carbono .....	42
3.9. Evaluación de crecimiento del consorcio microbiano en hidrolizados de cáscara de arroz .....	43
3.10. Detoxificación del hidrolizado lignocelulósico de cáscara de arroz.....	43
3.11. Ensayos de crecimiento y producción de hidrógeno a escala <i>Erlenmeyer</i> .....	44
3.12. Producción de hidrógeno mediante fermentaciones a escala biorreactor de 5 L.....	45

<b>4. RESULTADOS</b> .....	47
4.1. Ensayo de linealidad de los métodos analíticos.....	47
4.2. Composición de los hidrolizados químicos lignocelulósicos.....	48
4.3. Análisis de aptitud de los sustratos lignocelulósicos mediante sistema de puntajes.....	53
4.4. Adaptación del consorcio microbiano al medio definido de Logan mediante pasajes sucesivos.....	54
4.5. Producción de hidrógeno mediante fermentación anaeróbica en medio definido de Logan.....	56
4.6. Crecimiento del consorcio bacteriano en medio definido de Logan con distintas fuentes de carbono.....	58
4.7. Crecimiento del consorcio bacteriano en hidrolizados de cáscara de arroz.....	62
4.8. Detoxificación del hidrolizado lignocelulósico de cáscara de arroz.....	65
4.9. Ensayos de crecimiento y producción de biohidrógeno en frascos <i>Erlenmeyer</i> .....	67
4.10. Escalado de la producción de hidrógeno mediante fermentaciones en biorreactor.....	73
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	81
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	93
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	95

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Aspectos generales

Actualmente, el suministro mundial de energía depende en gran medida de los combustibles fósiles, aunque se están realizando esfuerzos significativos en todo el mundo para utilizar combustibles producidos a partir de materias primas renovables, debido a que estos son menos contaminantes. En este sentido, el hidrógeno se ha convertido en una de las fuentes de energía más prometedoras porque su combustión es limpia y eficiente, siendo utilizado en pilas de combustible para generar electricidad (Das & Veziroğlu, 2001). A pesar de estas ventajas, hoy en día el 96 % de este gas se produce a partir de combustibles fósiles, como el metano, liberando gases de efecto invernadero a la atmósfera como el CO<sub>2</sub> (Łukajtis *et al.*, 2018). Por este motivo, es preciso continuar optimizando y mejorando los métodos sustentables para la producción de hidrógeno. Uno de ellos es la producción de hidrógeno biológico, también conocido como “biohidrógeno”, el cual se genera como subproducto del metabolismo de ciertas bacterias, principalmente del género *Clostridium* (Wang & Yin, 2019). En la actualidad, el principal obstáculo para la comercialización del biohidrógeno es su costo de producción, sin embargo, debe tenerse en cuenta que se han realizado avances en lo relativo a este inconveniente y que el costo de obtención del biohidrógeno es hoy similar al de otros métodos alternativos de generación (European Biogás Association, 2023). Por esta razón, existe la necesidad de continuar implementando estrategias que permitan convertir al hidrógeno biológico en un combustible viable económicamente. Una de las formas de reducir el costo del biohidrógeno es llevar a cabo su producción a partir de materias primas renovables y de bajo costo, como por ejemplo los materiales lignocelulósicos. Así, se ha reportado que a partir de distintos sustratos residuales lignocelulósicos se han obtenido hidrolizados lignocelulósicos aptos para la producción de biohidrógeno mediante fermentación con consorcios microbianos (Cheng *et al.*, 2011). En particular, la fermentación oscura es el proceso de producción de biohidrógeno más estudiado y el que se presenta como más prometedor. Este proceso se lleva a cabo en condiciones anaeróbicas y produce una mezcla de gases rica en hidrógeno a partir de un medio de cultivo con nutrientes (Łukajtis *et al.*, 2018). Este tipo de fermentación la pueden llevar a cabo bacterias anaerobias estrictas como las del género *Clostridium spp.* y anaerobias facultativas como *Enterobacter spp.* (Wang & Yin, 2019), entre otras.

Por estos motivos, en este trabajo de tesis de grado se realizó una evaluación de distintos sustratos lignocelulósicos con el fin de seleccionar el más apropiado para la obtención de hidrolizados lignocelulósicos adecuados para la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura con un consorcio microbiano. Cabe aclarar que, dichos hidrolizados lignocelulósicos se obtuvieron mediante hidrólisis química con una solución ácida diluida y el consorcio microbiano utilizado provino de una cámara anaeróbica de una planta de tratamiento de aguas servidas (PTAS) de una embarcación de la Armada (ARA). Asimismo, en este trabajo de tesis se evaluó el crecimiento del consorcio microbiano en hidrolizado lignocelulósico y la concomitante

producción de biohidrógeno, mediante cultivos anaeróbicos en frascos *Erlenmeyer*. Finalmente, se realizó el escalado de la producción de biohidrógeno mediante fermentaciones anaeróbicas del consorcio microbiano en biorreactor de tanque agitado de 5 L con hidrolizado lignocelulósico.

## 1.2. Hidrógeno como combustible

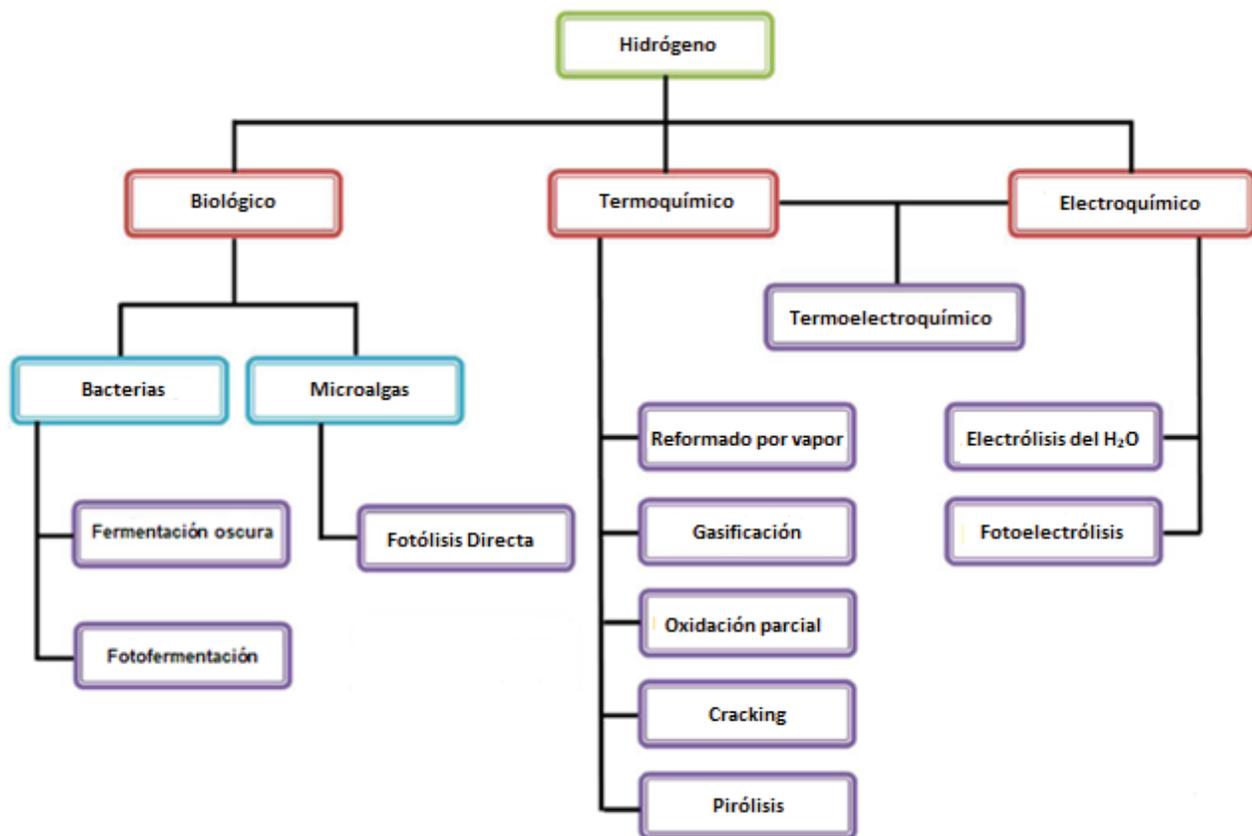
El hidrógeno es un combustible limpio que, al ser combustionado con oxígeno puro, genera solamente agua como producto, mientras que si la combustión tiene lugar con aire a altas temperaturas se genera  $\text{NO}_2$  y derivados (Lewis, 2021). Se espera que el hidrógeno cumpla un rol fundamental en tres áreas: el almacenamiento del exceso de energía renovable cuando la red eléctrica no puede absorberla, la descarbonización de sectores difíciles de electrificar como el transporte de larga distancia y la industria pesada, y el reemplazo de los combustibles fósiles como materia prima libre de emisiones en la producción de productos químicos y combustibles (Van Renssen, 2020). Cabe destacar que, actualmente, este gas se utiliza principalmente en la industria del refinamiento del petróleo y en la síntesis de amoníaco para fertilizantes (Bartlett & Krupnick, 2020).

Hasta la actualidad, diversos países han comenzado a trazar sus estrategias con relación a la industria del hidrógeno. En particular, la Unión Europea ha establecido su estrategia en relación al hidrógeno con objetivos en la producción, movilidad y aplicaciones como combustible del transporte de carga aéreo y ferroviario, que demandará una inversión de 430 mil millones de euros y financiamiento de asistencia por 145 mil millones de euros hacia 2030 (European Commission, 2020) (Mateo, J. & Suster, M., 2021). Asimismo, el departamento de Energía de Estados Unidos anunció inversiones por 100 millones de dólares solamente para el desarrollo e investigación de celdas de combustible para generación de energía eléctrica a partir del hidrógeno (U.S. Department of Energy, 2020). Por su parte, en Argentina existen proyectos piloto para la producción de hidrógeno renovable (Connor Fernandez, 2023) y desde el estado nacional también se ha fomentado la investigación y desarrollo en este sector (Dirección Nacional de Proyectos Estratégicos, 2023). Con respecto a los métodos de producción de hidrógeno, estos abarcan los termoquímicos y electroquímicos, que son los procedimientos convencionales, y por otro lado se encuentran los métodos biológicos. Los métodos convencionales incluyen el reformado de metano por vapor de  $\text{H}_2\text{O}$ , la gasificación de hidrocarburos, la oxidación parcial no catalítica de combustibles fósiles, y el cracking y pirólisis del metano, los cuales son procedimientos termoquímicos; y por otro lado la electrólisis del  $\text{H}_2\text{O}$  y la foto electrólisis del  $\text{H}_2\text{O}$  que son procesos electroquímicos de producción de  $\text{H}_2$ . En particular, en los procesos termoelectroquímicos de producción de  $\text{H}_2$  se utilizan fuentes de calor para generar electricidad y con ella llevar a cabo el procedimiento de electrólisis del  $\text{H}_2\text{O}$  (Singh *et al.*, 2015).

Sin embargo, la mayoría de estos métodos de producción de H<sub>2</sub> son procesos intensivos en energía y algunos requieren altas temperaturas, como ser el método de reformado de metano por vapor de H<sub>2</sub>O, por lo que dicha característica se presenta con una desventaja operativa y de costo (Perera *et al.*, 2010).

Según ha reportado Łukajtis *et al.* (2018), aproximadamente el 96 % de la producción de hidrógeno proviene de combustibles fósiles, principalmente a partir del proceso de reformado con vapor de H<sub>2</sub>O del gas natural, compuesto principalmente por metano (CH<sub>4</sub>); mientras que solo alrededor del 4 % se obtiene a través del proceso de electrólisis del H<sub>2</sub>O.

Por otro lado, los métodos biológicos de producción de H<sub>2</sub> pueden utilizar la luz solar, el CO<sub>2</sub> o los desechos orgánicos como sustratos para la obtención de este biocombustible, lo cual convierte a estos métodos en beneficiosos respecto a los métodos convencionales (Singh *et al.*, 2015). Los métodos biológicos de producción de H<sub>2</sub> se describen en la Sección 1.4. En la **Figura 1** se indican los principales métodos de producción de hidrógeno.



**Figura 1. Principales métodos de producción de hidrógeno.** Se indican los métodos termoquímicos y electroquímicos, que son los convencionales, y también los métodos biológicos. Cuadro elaborado en base a los trabajos de Singh *et al.* (2015) y Perera *et al.* (2010).

### 1.3. Análisis tecno-económico

Con respecto al rendimiento de hidrógeno, el proceso de producción por reformado del metano con vapor de H<sub>2</sub>O presenta un rendimiento aproximado de 0,74 mol H<sub>2</sub>/mol CH<sub>4</sub> (Abdalla *et al.*, 2018). Por otra parte,

el rendimiento del proceso de electrólisis del H<sub>2</sub>O generalmente se calcula en función de la energía consumida, ya que esta es el insumo limitante, exhibiendo un valor de aproximadamente 9-10 mol H<sub>2</sub>/kW·h (Kurrer, 2020). En relación con el proceso de fermentación oscura, la misma tiene un rendimiento máximo teórico de 4 mol H<sub>2</sub>/mol<sub>hexosa</sub>, lo que equivale a 44,41 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub>. En este sentido, para el proceso de fermentación oscura normalmente se reportan rendimientos de entre 11,1 a 22,2 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub> (Cheng *et al.*, 2011), aunque se han informado rendimientos elevados de 42,19 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub> (Kumar *et al.*, 2001).

Dado que la competitividad de los diferentes métodos de producción se encuentra estrechamente vinculada al costo de producción del producto de interés (Avella *et al.*, 2001), a continuación, se presenta un análisis comparativo del costo de producción de hidrógeno a partir de combustibles fósiles, mediante electrólisis del H<sub>2</sub>O y por fermentación oscura. Los valores de costo de producción pueden proporcionar una perspectiva más integral en la comparación de los procesos de producción de hidrógeno, ya que para su cálculo se consideran además del rendimiento y productividad otros parámetros relevantes tales como la inversión inicial, el costo operativo, y el costo de mantenimiento de equipos, entre otros factores (Dinesh *et al.*, 2018). En primer lugar, es importante destacar que el costo estimado de producción de hidrógeno mediante el método de reformado del gas natural con vapor de H<sub>2</sub>O en Estados Unidos es aproximadamente 1 USD/kg H<sub>2</sub> (International Energy Agency, 2018), siendo este proceso con el cual se produce el 95 % del hidrógeno en dicho país (U. S. Department of Energy, 2020). En cuanto al costo de producción de hidrógeno electrolítico, es decir mediante electrólisis del H<sub>2</sub>O, este varía según el método específicamente utilizado. Para el proceso de electrólisis del H<sub>2</sub>O con alta temperatura, el costo promedio oscila entre 2,35 y 4,8 USD/kg H<sub>2</sub>, en comparación con el costo de producción más elevado registrado para la electrólisis del H<sub>2</sub>O con energía eólica y solar, que en ambos casos supera los 7 USD/kg H<sub>2</sub> (El Hajj Chehade *et al.*, 2020). A su vez, cabe mencionar que el Departamento de Energía de Estados Unidos en 2021 ha propuesto la meta de disminuir el costo del hidrógeno electrolítico a 1 USD/kg H<sub>2</sub> para el año 2030, con un objetivo intermedio de 2 USD/kg H<sub>2</sub> para el año 2025; este esfuerzo se centra en la mejora de diversos aspectos, incluyendo el rendimiento, y el costo y durabilidad de los equipos electrolizadores (U. S. Department of Energy, 2023).

Con respecto al costo del proceso de producción de H<sub>2</sub> mediante fermentación oscura, este depende de diversas variables como ser la materia prima, el consorcio microbiano utilizado, el tiempo del proceso, el rendimiento y productividad obtenidos, el volumen final de cultivo, entre otros factores. En este sentido, Li *et al.* (2012) calcularon un costo de producción de H<sub>2</sub> mediante fermentación oscura de 7,82 USD/kg H<sub>2</sub> utilizando residuos de granjas de champiñones como materia prima. Asimismo, Han *et al.* (2016) realizaron una estimación del costo de producción de H<sub>2</sub> también mediante fermentación oscura, obteniendo un valor de 11,3 USD/kg H<sub>2</sub>, el cual se basó en la utilización de residuos de alimentos como materia prima en China. Sin embargo, se han reportado otras estimaciones más favorables para el costo de este proceso

fermentativo, como la reportada por Dinesh *et al.* (2018), con un valor de 3,2 USD/kg H<sub>2</sub>, quienes también emplearon residuos de alimentos como materia prima, en este caso en India.

#### 1.4. Hidrógeno biológico

Existen 3 procesos metabólicos principales para la producción biológica de hidrógeno. Estos son (1) la fotólisis directa, en la cual las cianobacterias descomponen el H<sub>2</sub>O para generar hidrógeno y oxígeno en presencia de luz; (2) la fotofermentación, donde las bacterias fotoheterótrofas anoxigénicas utilizan materia orgánica para producir H<sub>2</sub> en presencia de luz; y (3) la fermentación oscura, en la cual las bacterias heterótrofas anaeróbicas utilizan materia orgánica para producir H<sub>2</sub> sin necesidad lumínica (Perera *et al.*, 2010).

La fotólisis directa es un proceso fotosintético en el cual la molécula de H<sub>2</sub>O se divide para generar hidrógeno y oxígeno utilizando energía lumínica. Este proceso es llevado a cabo por cianobacterias y microalgas, pudiendo emplearse fotobiorreactores para su ejecución a gran escala (Academy of Sciences Malaysia, 2022). Un ejemplo de cianobacterias productoras de hidrógeno son las del género *Anabaena spp.*, donde la formación de biohidrógeno ocurre bajo condiciones anaeróbicas en células especializadas, denominadas heterocistos, por acción de las mismas enzimas que fijan nitrógeno molecular (Yu & Takahashi, 2007). En cuanto a la producción de H<sub>2</sub> mediante fotólisis directa con microalgas, se destacan principalmente cepas de la especie *Chlamydomonas reinhardtii*. Para favorecer la generación de hidrógeno por parte de esta microalga, se pueden realizar cultivos bajo condiciones anaeróbicas y en un medio de cultivo libre de azufre (Tsygankov *et al.*, 2006).

Por otro lado, la fotofermentación es llevada a cabo por bacterias púrpuras no sulfurosas (PNSB, por sus siglas en inglés), que producen hidrógeno durante el crecimiento fotoheterotrófico a partir de fuentes de carbono orgánico utilizando energía lumínica. Los electrones generados durante la oxidación de los sustratos orgánicos reaccionan con protones para formar H<sub>2</sub>, en un proceso catalizado por la enzima nitrogenasa. Durante la producción de H<sub>2</sub> por medio de este proceso metabólico no se genera O<sub>2</sub>, por lo cual no ocurre la inhibición de la nitrogenasa inducida por el hidrógeno. El proceso de producción de H<sub>2</sub> mediante fotofermentación ocurre en condiciones de anaerobiosis y limitación de nitrógeno. Las especies de PNSB más utilizadas para la producción de H<sub>2</sub> son *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodoseudomonas palustris* y *Rhodospirillum rubrum* (Androga *et al.*, 2012).

La fermentación oscura es el método de producción de biohidrógeno más estudiado y el que se presenta como más prometedor. Mediante este proceso de fermentación, los microorganismos, principalmente bacterias, convierten la materia orgánica en ácidos orgánicos e hidrógeno. Es un proceso anaeróbico que ocurre de manera independiente de la presencia de luz (Łukajtis *et al.*, 2018). Dicha materia orgánica puede provenir de la biomasa lignocelulósica, como residuos agrícolas y forestales. Asimismo, otros tipos de

materias primas que contengan elevada proporción de carbohidratos también pueden ser fuentes potenciales para la obtención de hidrógeno mediante fermentación oscura, como ser cultivos agrícolas con alto contenido de azúcar y almidón, residuos sólidos orgánicos municipales, y aguas residuales de industrias alimentarias y efluentes industriales (Guo *et al.*, 2010). Este metabolismo fermentativo lo pueden llevar a cabo, en ausencia de luz, bacterias anaerobias de los géneros *Enterobacter spp.*, *Bacillus spp.* y *Clostridium spp.* (Sarangi & Nanda, 2020), entre otros. Se ha evaluado el uso de cultivos microbianos puros como así también cultivos mixtos o consorcios microbianos, como inóculos del proceso de fermentación oscura. Por lo general, los consorcios o cultivos mixtos son más favorables y prácticos para la producción de H<sub>2</sub> que los cultivos puros, debido a su gran diversidad microbiana capaz de metabolizar rápidamente una amplia gama de sustratos, además de no requerir de una estricta condición aséptica, lo que facilita su manejo y reduce el costo de operación (Dzulkarnain *et al.*, 2022).

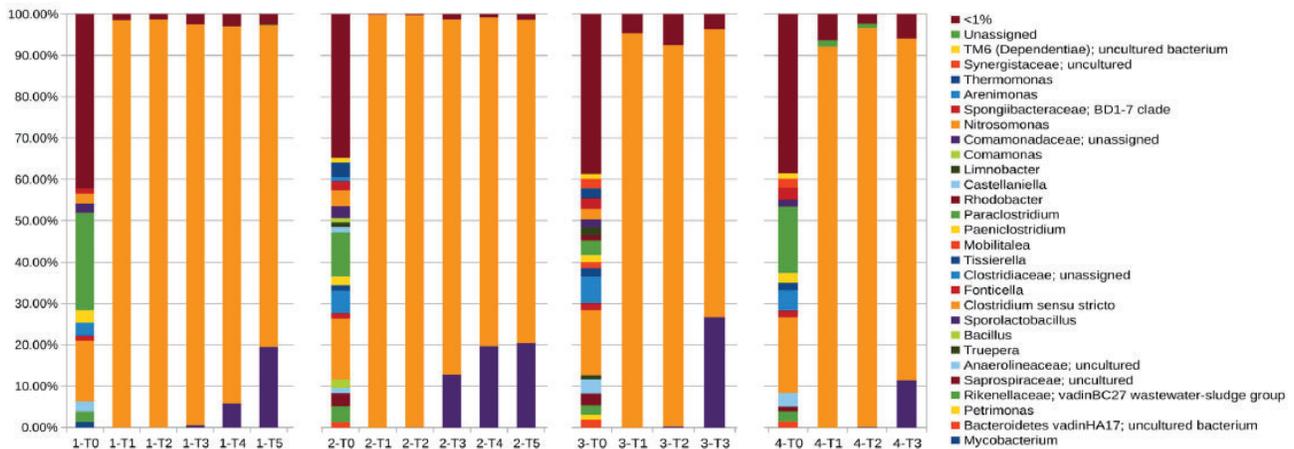
Cabe destacar que existen procedimientos de producción de hidrógeno que combinan los procesos metabólicos detallados. En este sentido, la implementación en secuencia de la fermentación oscura con la fotofermentación puede presentar un rendimiento total de H<sub>2</sub> superior que los procesos individuales y disminuir la emisión del CO<sub>2</sub> producido durante la fermentación oscura (Cheng *et al.*, 2011).

### **1.5. Consorcios microbianos**

Tal como se detalló anteriormente, en el proceso de fermentación oscura, los consorcios microbianos o cultivos mixtos, presentan la ventaja de poder metabolizar rápidamente una amplia variedad de sustratos y además no requieren una estricta condición aséptica durante el proceso (Dzulkarnain *et al.*, 2022). Sin embargo, en un sistema de cultivo mixto bajo condiciones anaeróbicas, el hidrógeno producido por bacterias, como las del género *Clostridium spp.* o *Enterobacter spp.*, a menudo es consumido rápidamente por otras bacterias que poseen esta capacidad. Por lo tanto, para evitar esta problemática y aprovechar el hidrógeno generado por cultivos mixtos, el consorcio microbiano debe ser sometido a un pretratamiento para suprimir a las bacterias que consumen hidrógeno, y al mismo tiempo conservar a las bacterias productoras de este gas (C. Li & Fang, 2007). Usualmente, este pretratamiento se basa en la capacidad de formar esporas que presentan bacterias como las del género *Clostridium spp.*, destacadas productoras de hidrógeno y presentes en lodos y sedimentos anaeróbicos (Wiegel *et al.*, 2006).

En un trabajo realizado por García *et al.* en 2012, se evaluó la producción de hidrógeno mediante fermentación oscura a partir de 3 inóculos microbianos distintos: una muestra de suelo obtenida a 15 cm de profundidad, compost comercial y materia orgánica proveniente de un biodigestor anaeróbico. Aunque los consorcios provenientes de los 3 inóculos lograron producir hidrógeno, el que mayor cantidad de este gas produjo fue el proveniente del biodigestor anaeróbico. Asimismo, en otro trabajo realizado por el mismo grupo de investigación (García *et al.*, 2023), analizaron la composición microbiana de cultivos anaeróbicos

durante procesos de fermentación oscura inoculados con un consorcio proveniente de un biodigestor anaeróbico, mediante secuenciación de ARN ribosomal 16S y determinaron que las bacterias del género *Clostridium spp.* y *Sporolactobacillus spp.* fueron las predominantes a lo largo del proceso de producción de hidrógeno. Por un lado, *Clostridium spp.* mostró mayor predominancia al inicio del proceso de fermentación oscura, con más del 90 % de abundancia relativa, mientras que al final del proceso este género presentó valores cercanos al 80 % de abundancia y *Sporolactobacillus spp.* alcanzó valores próximos al 20 %, tal como se puede observar en la **Figura 2**.



**Figura 2. Análisis taxonómico a nivel de género de un consorcio microbiano a lo largo del proceso de fermentación oscura en biorreactor.** Se indica la abundancia relativa de los distintos géneros presentes en un consorcio bacteriano durante 4 procesos *batch* de fermentación oscura en biorreactor de tanque agitado de 5 L. Mediante diferentes colores se indica cada género presente a distintos tiempos de las fermentaciones, desde T0 hasta T5 (horas), para los primeros 2 lotes y de T0 a T3 (horas) para los siguientes 2 lotes. El análisis a tiempo T0 se efectuó previo al pretratamiento térmico del inóculo. Los géneros predominantes a partir de T1 de todas las fermentaciones fueron *Clostridium spp.* (naranja) y *Sporolactobacillus spp.* (violeta). La técnica utilizada para la identificación a nivel de género fue la secuenciación del ARN ribosomal 16S (García *et al.*, 2023).

Las bacterias del género *Clostridium spp.* han sido ampliamente estudiadas por su capacidad para producir hidrógeno a partir de diversas fuentes de carbohidratos. Por otro lado, la función de las bacterias ácido-lácticas, en particular *Sporolactobacillus spp.*, en relación con la producción de biohidrógeno aún no se encuentra totalmente definida (García *et al.* 2023). En este sentido, en el trabajo de Monlau *et al.* (2014), se evaluó la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de tallos de girasol obtenidos mediante hidrólisis ácida e inoculando los mismos con un consorcio microbiano sometido a pretratamiento térmico. En dicho trabajo, se determinó que el género *Sporolactobacillus spp.* llegó a ser dominante, constituyendo aproximadamente el 70 % de la comunidad bacteriana, a expensas del género *Clostridium spp.* Los autores de este estudio sugirieron que los subproductos resultantes de la hidrólisis ácida del sustrato lignocelulósico, como furfurales, compuestos fenólicos y acetato, indujeron un cambio en la composición de la comunidad

bacteriana hacia las bacterias ácido-lácticas y que la actividad de estas bacterias generó condiciones estresantes para las cepas de *Clostridium spp.*, desfavoreciendo la producción de hidrógeno.

Asimismo, otras bacterias ácido-lácticas como ciertas del género *Lactobacillus spp.* pueden disminuir la producción de H<sub>2</sub> al secretar bacteriocinas en el medio de cultivo, lo que puede generar condiciones estresantes para las células clostridiales y por ende causar un cambio en su vía metabólica de producción de H<sub>2</sub> y llevar a la producción de solventes como el etanol (Noike *et al.*, 2002). En consecuencia, la presencia de bacterias del género *Sporolactobacillus spp.* en consorcios bacterianos puede estar asociada con la disminución de la producción de hidrógeno.

### **1.6. Metabolismo de *Clostridium spp.***

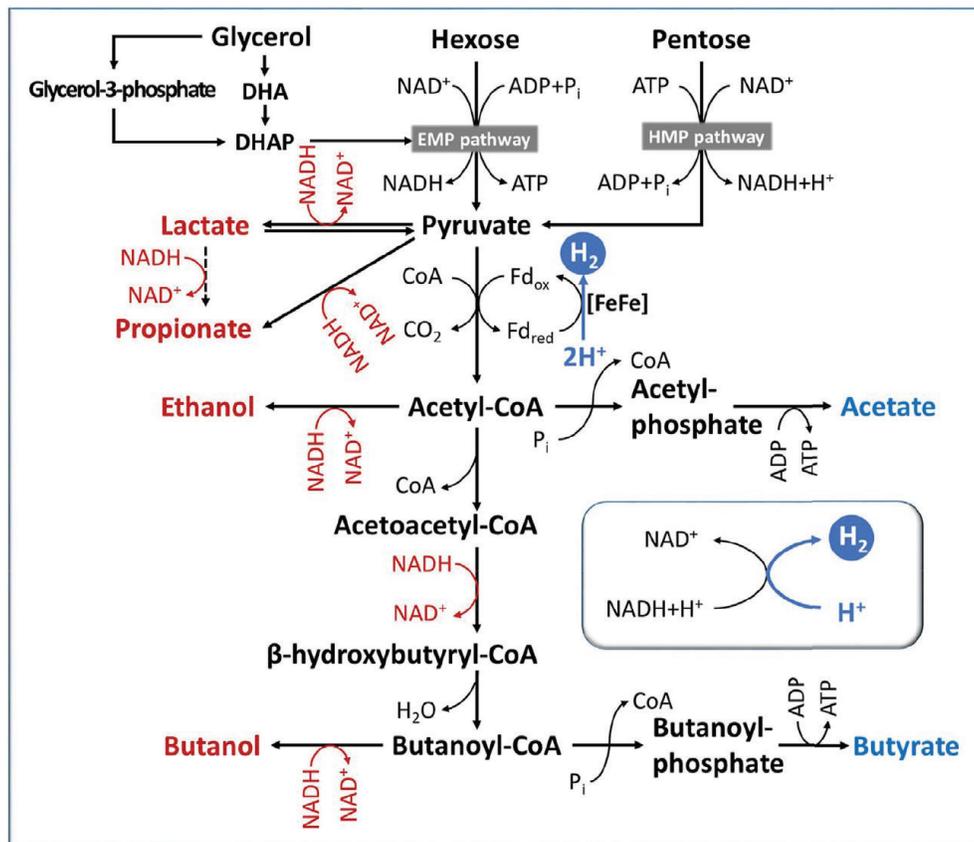
La definición del género *Clostridium spp.* previamente a la clasificación de bacterias por ARN ribosómico era: bacterias formadoras de esporas no reductoras de sulfato con un metabolismo anaerobio estricto y una pared celular del tipo Gram positivo. Actualmente, se define la estructura taxonómica general de los organismos procariotas, en su mayor parte, en función de las relaciones reveladas por la comparación de secuencias del gen 16S del ARN ribosómico. Esto ha llevado a trasladar muchas especies antiguas de clostridios a nuevos géneros y a una definición más estrecha del género *Clostridium spp.* (referido comúnmente como *Clostridium sensu stricto*) (Wiegel *et al.*, 2006). Las especies de *Clostridium spp.* productoras de hidrógeno están ampliamente presentes en el suelo, agua e intestino de los animales. Cuando se utiliza un consorcio microbiano, proveniente de dicho origen, como inóculo del proceso de fermentación oscura para producción de hidrógeno, generalmente se aplica un pretratamiento térmico para inhibir los microorganismos consumidores de este gas (Wang & Yin, 2021).

Todas las vías metabólicas pertenecientes al género *Clostridium spp.*, implicadas en la síntesis de hidrógeno, consisten en primer lugar en la oxidación y conversión de las fuentes de carbono a piruvato. En el caso de las hexosas, pueden ser convertidas directamente a piruvato a través de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), junto con la formación de adenosín trifosfato (ATP) y dinucleótido reducido de nicotinamida adenina (NADH), a partir de adenosín difosfato (ADP) y nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) (Park *et al.*, 2019). En cuanto al glicerol como sustrato, primero se produce dihidroxiacetona (DHA) a partir de su oxidación, y luego se forma dihidroxiacetona fosfato (DHAP) mediante fosforilación de DHA y finalmente el DHAP se convierte en piruvato a través de la vía de EMP (Gungormusler-Yilmaz *et al.*, 2014). Además, en algunas cepas de *Clostridium spp.*, el glicerol también puede convertirse en DHAP a través de la vía de la enzima glicerol-P-deshidrogenasa (González-Pajuelo *et al.*, 2006). En el caso de las pentosas, su conversión a piruvato sigue la vía de la hexosa monofosfato (HMP), acompañada del consumo de ATP y formación de NADH (Liu *et al.*, 2006). El piruvato generado a partir de las vías EMP y HMP se metaboliza por medio de reacciones de reducción y oxidación. Así, mediante reducción, el piruvato se puede convertir en lactato junto con la

conversión de NADH en NAD<sup>+</sup>. A través de la reacción de oxidación, el piruvato se oxida a CO<sub>2</sub> y acetyl-CoA, junto con la formación de ferredoxina reducida (Fd<sub>red</sub>). La Fd<sub>red</sub> puede ser posteriormente oxidada por una hidrogenasa generando en consecuencia una molécula de hidrógeno. En la posterior conversión de la acetyl-CoA, generada a partir del piruvato, tiene lugar la formación de acetato y butirato acompañada por la producción de ATP, y también puede ocurrir la formación de etanol y butanol junto con el consumo de NADH. A lo largo de estas vías metabólicas, los electrones utilizados para la formación de hidrógeno molecular provienen de las reacciones de oxidación del glicerol y carbohidratos a piruvato y de la oxidación de piruvato a acetyl-CoA. Luego, en particular, el hidrógeno se genera de las siguientes 3 maneras:

- 1) Mediante oxidación de Fd<sub>red</sub> a través de la actividad de una [FeFe]-hidrogenasa del tipo de las presentes en *Clostridium pasteurianum*.
- 2) A partir de NADH mediante la acción de hidrogenasas [FeFe] multiméricas.
- 3) A partir de Fd<sub>red</sub> y NADH mediante la actividad de una [FeFe]-hidrogenasa bifurcadora trimérica.

Por lo tanto, las vías que producen NADH y Fd<sub>red</sub> son favorables para la producción de hidrógeno, mientras que las vías que consumen NADH y Fd<sub>red</sub> son restrictivas para su producción. En la **Figura 3** se detallan todas las vías metabólicas implicadas en la síntesis de hidrógeno.



**Figura 3.** Vías metabólicas del género *Clostridium* spp implicadas en la síntesis de hidrógeno. Se detallan las vías de formación de acetato y butirato junto con la producción de ATP, las vías de formación de etanol y butanol con consumo de NADH, y las reacciones de síntesis de hidrógeno mediante oxidación de ferredoxina y NADH (Wang & Yin, 2021).

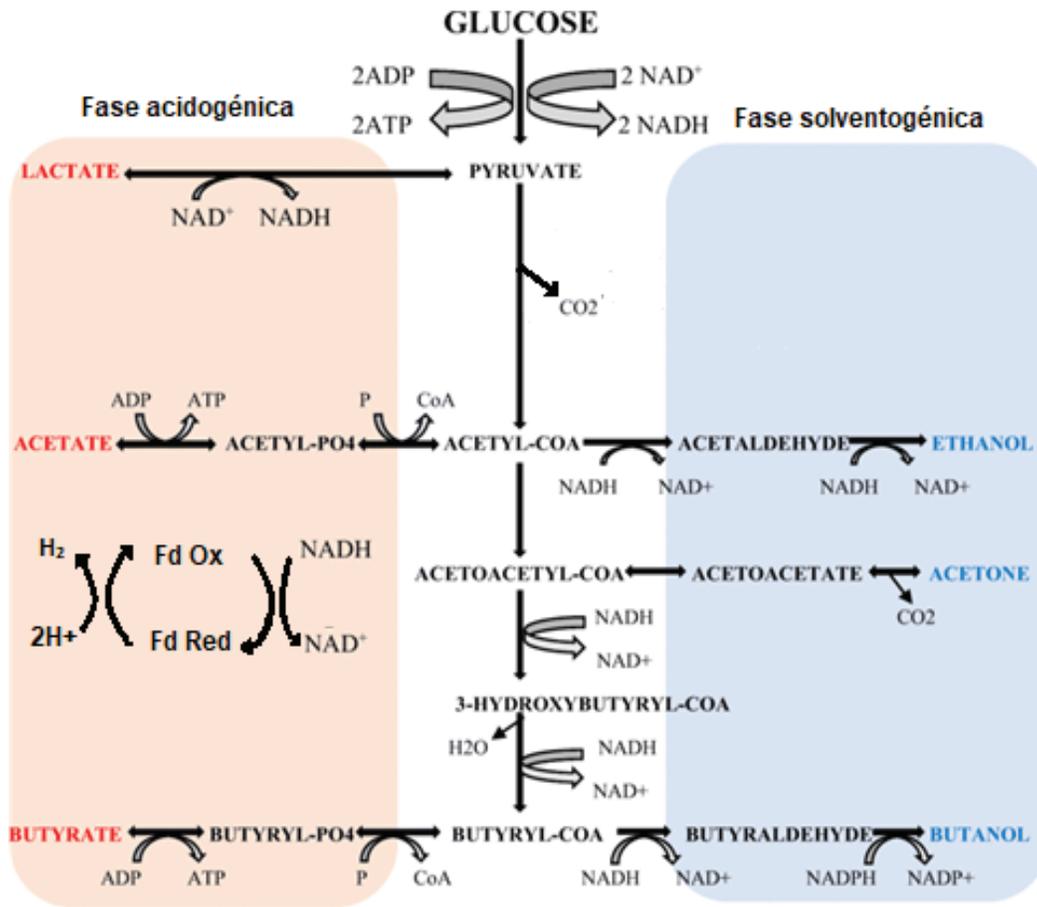
Los rendimientos teóricos de hidrógeno correspondientes a las vías del ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, etanol y butanol, detalladas en la **Figura 3**, y partiendo de glucosa como fuente de carbono, se pueden calcular de acuerdo con las siguientes ecuaciones de cada vía:

- Vía del ácido acético:  $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$
- Vía del ácido propiónico:  $C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$
- Vía del ácido butírico:  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$
- Vía del etanol:  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$
- Vía del butanol:  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2CH_2OH + 2CO_2 + H_2O$

El rendimiento teórico de hidrógeno más elevado se consigue por medio de la vía del ácido acético, con un valor de 4 moles de  $H_2$  por mol de glucosa, debido a que no se genera un consumo adicional de NADH con la formación de acetato. Por otra parte, la vía del ácido butírico presenta un rendimiento teórico de hidrógeno de 2 moles de  $H_2$  por mol de glucosa, debido a que en esta vía se produce un consumo adicional de 2 moles de NADH por cada mol de piruvato. Mientras que, en la vía del ácido propiónico se consume hidrógeno, y las vías del etanol y butanol no producen hidrógeno.

Se ha reportado que, estas vías metabólicas se pueden alternar en base a las condiciones de reacción, sustrato disponible y la especie microbiana, por lo que el rendimiento de  $H_2$  se podría modificar mediante el control de ciertas condiciones de cultivo (Yin & Wang, 2016) (Mizuno *et al.*, 2000) (Moon *et al.*, 2015).

Por otro lado, según Jang *et al.* (2012) si se extiende la fermentación oscura con bacterias del género *Clostridium spp.* por un tiempo prolongado, ocurre un proceso bifásico. Este modelo de fermentación bifásica clostridial, consiste en la fase acidogénica o acidogénesis y la fase solventogénica o solventogénesis. En la fase acidogénica se produce ácido acético y ácido butírico junto con ATP, y también se genera ácido láctico, durante la cual ocurre el crecimiento celular. En esta fase se produce el hidrógeno a partir de la oxidación de ferredoxina reducida y NADH. Luego, una parte de estos ácidos orgánicos formados serían posteriormente utilizados para la producción de alcoholes y solventes como etanol, butanol y acetona, durante la fase solventogénica. Así, la solventogénesis, en la cual se produce principalmente etanol y butanol (Ndaba *et al.*, 2015), está asociada con el aumento del pH externo debido a la captación de los ácidos orgánicos mencionados (Zheng *et al.*, 2015). La transición entre estas dos fases estaría causada por el repentino cambio en los patrones de expresión génica (Lee *et al.*, 2008). En la **Figura 4** se resumen las principales reacciones bioquímicas de ambas fases, partiendo de glucosa como fuente de carbono.



**Figura 4. Vías metabólicas en la fermentación bifásica de *Clostridium*.** En la fase acidogénica o acidogénesis (área rosada) se describe la formación de ácidos orgánicos (escritos en rojo), mientras que en la fase solventogénica o solventogénesis (área celeste) se detalla la formación de alcoholes y solventes (escritos en azul). La producción de hidrógeno ocurre solamente en la fase acidogénica, a partir de la oxidación de ferredoxina reducida y NADH (Abo *et al.*, 2019).

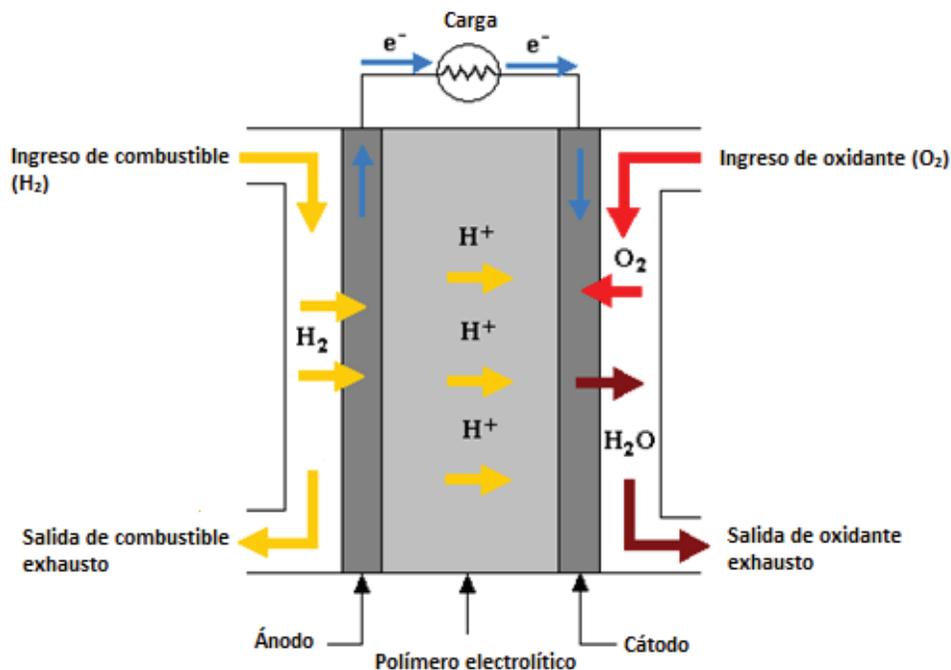
### 1.7. Celdas de combustible

Las celdas o pilas de combustible son dispositivos electroquímicos que utilizan la energía química del hidrógeno u otros combustibles para producir energía eléctrica mediante una reacción redox. Esta tecnología tiene el potencial de producir energía de manera limpia y eficiente, y sin generar emisiones nocivas. Si el hidrógeno es el combustible, y este se emplea para alimentar una pila del tipo membrana de intercambio de protones o PEM (siglas en inglés de *Proton Exchange Membrane*), los únicos productos resultantes son electricidad, agua y calor. Las celdas de combustible pueden proporcionar energía para sistemas tan grandes como una central eléctrica de servicios públicos y tan pequeños como una computadora portátil (U.S. Department of Energy, 2023).

La tecnología de celdas o pilas de combustible PEM es una de las más desarrolladas y se utiliza ampliamente en sistemas de calefacción residencial y también en vehículos de transporte. Después de más de una década de intenso esfuerzo de investigación y desarrollo, la tecnología PEM ofrece alta eficiencia, durabilidad y

confiabilidad, y los costos han disminuido notablemente debido a su producción en masa (Dodds *et al.*, 2015).

Una celda de combustible consta de tres componentes principales: dos electrodos (ánodo y cátodo) y un electrolito conductor. En el caso de las celdas de combustible PEM, cada electrodo está compuesto por un material poroso de elevada área superficial impregnado con un electrocatalizador, generalmente platino o una aleación de este. El material del electrolito es una membrana polimérica que actúa como conductor iónico entre ambos electrodos (NETL, 2004). La energía eléctrica en una celda de combustible es generada por dos reacciones químicas principales, como se ilustra en la **Figura 5**. En el caso de las celdas de combustible que operan con  $H_2$  puro, el gas se oxida generando protones y electrones en el ánodo. Los protones son conducidos a través de la membrana del electrolito, y los electrones circulan alrededor de la membrana, generando una corriente eléctrica. Los productos cargados ( $H^+$  y  $e^-$ ) se combinan con oxígeno en el cátodo (reacción de reducción), produciendo agua y calor (O'Hayre *et al.*, 2016).



**Figura 5. Esquema de una celda o pila de combustible del tipo PEM.** Se detallan los componentes de las celdas de combustible tipo PEM (membrana de intercambio de protones), como también el ingreso y salida de gases de la misma (Baker & Zhang, 2011).

### 1.8. Sustratos lignocelulósicos

Al hidrógeno biológico se lo puede considerar un biocombustible, debido a que es un recurso energético procesado por el ser humano a partir de materia orgánica producida recientemente por seres vivos, a la cual se denomina "biomasa" (Maciel, 2009). Los biocombustibles se pueden clasificar en primarios y secundarios. Los biocombustibles primarios consisten en biomasa no procesada utilizada principalmente para

calefaccionar, cocinar y en algunas ocasiones para generar electricidad. Algunos ejemplos de este tipo de combustibles son la leña y los chips o *pellets* de madera. Por otra parte, los biocombustibles secundarios se producen a partir del procesamiento de la biomasa, este es el caso del biohidrógeno, bioetanol y biodiesel, entre otros. A su vez, los biocombustibles secundarios se pueden dividir en tres grupos: de primera, segunda o tercera generación (Chakraborty *et al.*, 2012). Los biocombustibles de primera generación se producen a partir de partes alimenticias de plantas, ricas en almidón y sacarosa. Los biocombustibles de segunda generación se desarrollan a partir de residuos agrícolas y forestales, ricos en materia o sustancia lignocelulósica. Finalmente, los biocombustibles de tercera generación se producen a partir de microalgas o sustratos vegetales no alimenticios.

En la **Tabla 1** se indican los 3 grupos de biocombustibles secundarios y sus correspondientes materias primas, y además se detallan ejemplos de estas.

Biocombustible Secundario	Materia Prima	Ejemplos de materia prima
Primera Generación	Partes alimenticias de las plantas.	Jugo de la caña de azúcar, granos de maíz y sorgo, aceites de semillas oleaginosas, etc.
Segunda Generación	Residuos agrícolas y forestales (sustratos lignocelulósicos).	Cáscara de maní, cáscara de mandioca, bagazo de caña de azúcar, bagazo de cervecería, hojas de maíz, cáscara de arroz, etc.
Tercera Generación	Microalgas Sustratos vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y alta densidad energética.	<i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Botryococcus braunii</i> , entre otras microalgas. Árboles reducidos en lignina o maíz con celulasas integradas.

**Tabla 1. Clasificación de los biocombustibles secundarios según su biomasa de origen (materia prima).** Se indican los distintos tipos de biocombustibles secundarios según su materia prima y ejemplos de estas. Tabla elaborada a partir del trabajo de Maciel (2009).

En este trabajo de tesis se evaluaron distintos residuos lignocelulósicos agrícolas y forestales para la producción de hidrógeno, por tal motivo el biocombustible resultante corresponde a los de segunda generación. La utilización de residuos lignocelulósicos de la industria agrícola y forestal para la producción de biocombustibles presenta el beneficio de no generar el desvío de alimentos provenientes de la agricultura hacia el sector energético (Sims *et al.*, 2010). Además, existe un particular interés en aprovechar estos

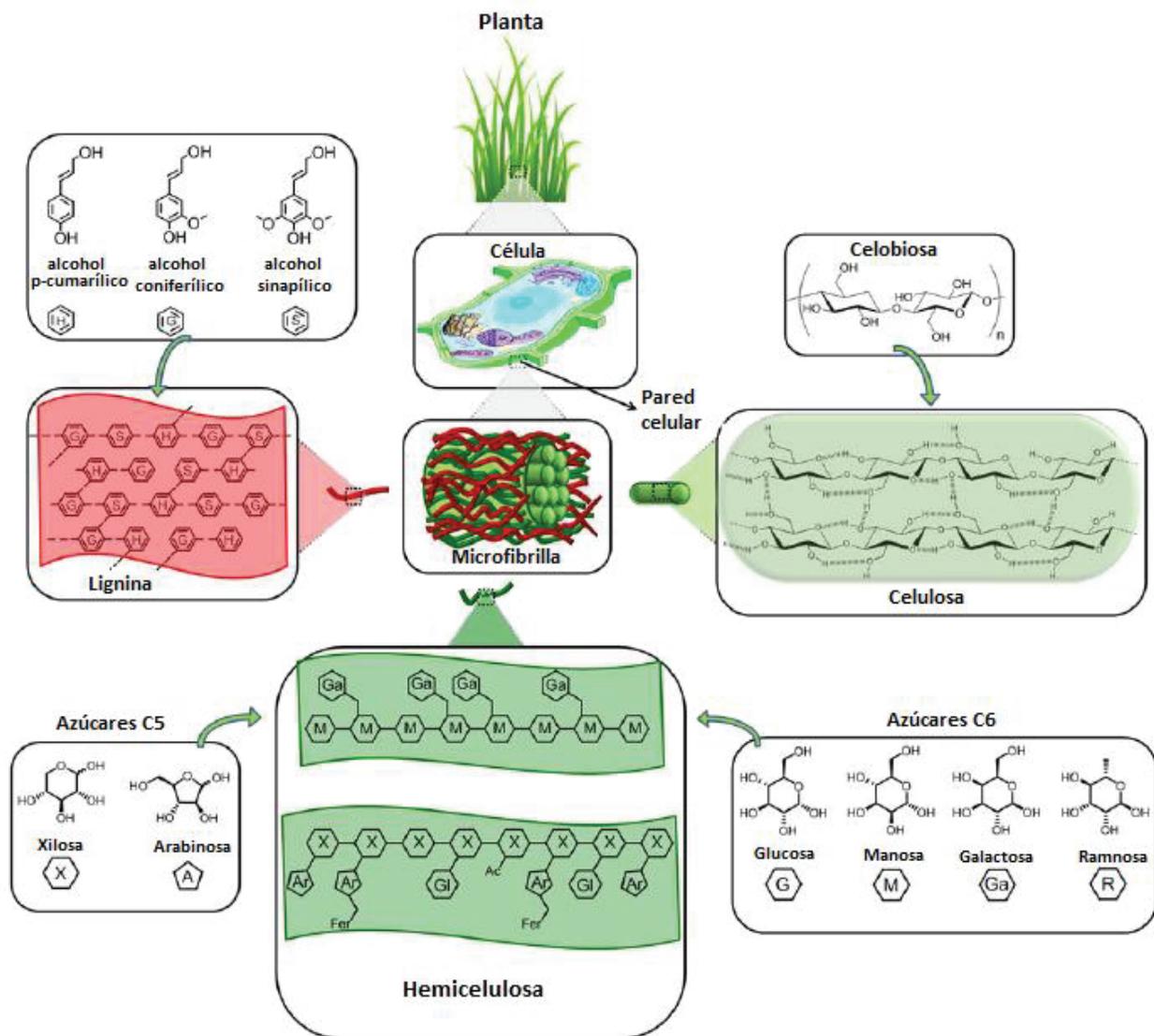
sustratos lignocelulósicos debido a que poseen la ventaja de ser de bajo costo, renovables y abundantes (Anwar *et al.*, 2014).

Los sustratos lignocelulósicos se denominan así porque están compuestos por celulosa y hemicelulosa, como así también por lignina. Las proporciones de estos tres componentes mayoritarios pueden variar según la especie vegetal y el ambiente en el que se desarrolla (Bajpai, 2016). La celulosa, componente fundamental de las paredes de las células vegetales, es un polímero lineal y se considera que su unidad monomérica es la celobiosa, formada por dos unidades de  $\beta$ -D-Glucosa unidas mediante un enlace  $\beta$ -glucosídico. El número promedio de unidades de glucosa en una molécula de celulosa es de aproximadamente 3.000 a 10.000. La linealidad extrema de las cadenas de celulosa permite la formación de una gran cantidad de puentes de hidrógeno entre hidroxilos de cadenas adyacentes. La estructura cristalina de la celulosa es una de las causas de la recalcitrancia de la biomasa lignocelulósica. La cristalinidad de la celulosa se debe a la red de enlaces de hidrógeno entre y dentro de las cadenas de esta molécula (Area, 2019).

La hemicelulosa, a diferencia de la celulosa, tiene una estructura amorfa y no repetitiva. Se compone de diferentes heteropolímeros incluidos xilano, galactomanano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xiloglucano. Además, puede variar en su composición según la especie vegetal, puesto que las maderas duras generalmente poseen hemicelulosas con alto contenido de xilano y las más blandas contienen mayoritariamente glucomananos. Los heteropolímeros de la hemicelulosa se componen de diferentes monosacáridos como pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y azúcares acetilados. La hemicelulosa también integra las paredes celulares vegetales formando complejas redes de enlaces que proveen fortaleza estructural, debido a la conexión que generan entre fibras de celulosa para formar microfibrillas y entrecruzamientos con la lignina (Isikgor & Becer, 2015).

La lignina es un polímero amorfo, aromático, insoluble en agua, heterogéneo, tridimensional y reticulado. Se considera que está formada por copolímeros aleatorios derivados de alcoholes insaturados de fenilpropano (Area, 2019). Este compuesto funciona como un pegamento celular que provee de resistencia ante la compresión a los tejidos vegetales y a las microfibrillas de celulosa individuales. Asimismo, la lignina aporta rigidez a la pared celular y actúa como barrera contra insectos y patógenos (Isikgor & Becer, 2015). Los heteropolímeros de la hemicelulosa y la lignina se unen en forma covalente, por medio de uniones que generalmente ocurren a través de residuos de galactosa y arabinosa de las cadenas laterales de la hemicelulosa (Chen, 2014).

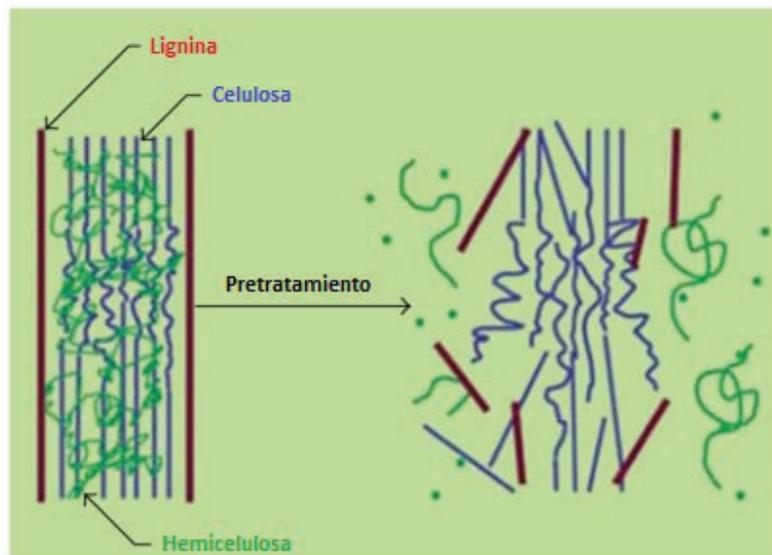
En la **Figura 6** se describe la estructura y composición de la sustancia lignocelulósica presente en las paredes de las células vegetales, detallando las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina.



**Figura 6. Estructura y principales componentes de la sustancia lignocelulósica.** Se detallan las fracciones de celulosa, compuesta por unidades de celobiosa (disacárido conformado por 2 glucosas); hemicelulosa, heteropolímero de pentosas y hexosas, y lignina, constituida por derivados fenólicos (Isikgor & Becer, 2015).

### 1.9. Pretratamiento de los sustratos lignocelulósicos

La producción de biocombustibles a partir de sustratos lignocelulósicos involucra el tratamiento previo de estos, que tiene como objetivo remover la lignina y degradar la celulosa y hemicelulosa, presente en las paredes celulares, generando azúcares de menor peso molecular. De esta manera, los azúcares resultantes son más fácilmente metabolizables por los microorganismos utilizados para la producción de biocombustibles. Los pretratamientos de los sustratos o biomasa lignocelulósica pueden ser físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos (Cheng *et al.*, 2011). En la **Figura 7** se indica lo que sucede con la estructura de la biomasa lignocelulósica durante su pretratamiento.



**Figura 7. Pretratamiento de la biomasa lignocelulosa.** Se indica la degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina durante el tratamiento de la matriz lignocelulósica presente en las paredes celulares vegetales (Brodeur *et al.*, 2011).

Los pretratamientos físicos involucran la disrupción mecánica de los sustratos lignocelulósicos con el fin de disminuir el tamaño de sus partículas, aumentando la relación superficie-volumen y de esta manera haciéndolos más susceptibles a la degradación química o enzimática (Lin *et al.*, 2010). Los pretratamientos físicos clásicos son la molienda o el chipeado, aunque también existen técnicas como irradiación con microondas y ultrasonido (Jędrzejczyk *et al.*, 2019).

Entre los pretratamientos fisicoquímicos, el más difundido es el método de explosión por vapor de agua, ya que implica un uso reducido de reactivos y bajo consumo de energía. Este método consiste en inyectar vapor de agua a alta presión a un reactor conteniendo la biomasa lignocelulósica. Durante este tratamiento, la temperatura asciende a 160°C - 260°C, y posteriormente, la presión se reduce de manera espontánea, desencadenando una descompresión explosiva sobre la biomasa. Este proceso resulta en la degradación de la hemicelulosa y la disgregación de la lignina. Otros pretratamientos fisicoquímicos de la biomasa lignocelulósica son la explosión con CO<sub>2</sub> y la expansión de la fibra de amoníaco (AFEX) (Harmsen *et al.*, 2010). Los pretratamientos químicos incluyen principalmente la hidrólisis ácida y alcalina, y los tratamientos con solventes orgánicos y agentes oxidativos. La hidrólisis ácida de los sustratos lignocelulósicos generalmente se lleva a cabo con ácido sulfúrico o clorhídrico diluido, consiguiendo principalmente la degradación de la hemicelulosa. En este proceso se liberan azúcares solubles, como glucosa y xilosa, con un buen rendimiento, los cuales sirven de sustrato para los microorganismos productores de biocombustibles (Brodeur *et al.*, 2011). A pesar de su efectividad y simplicidad, el método de hidrólisis ácida exhibe la desventaja de que durante su procedimiento se pueden formar compuestos tóxicos o inhibidores de los microorganismos involucrados en los procesos fermentativos. Los compuestos tóxicos o inhibidores más relevantes son los furfurales, generados principalmente a partir de las pentosas, como la xilosa (Gwak *et al.*, 2022), y los

compuestos fenólicos, provenientes de la despolimerización de la lignina (Chen *et al.*, 2020). Por otro lado, en el pretratamiento alcalino se utilizan bases, como el hidróxido de sodio o el carbonato de sodio, para solubilizar la lignina y hemicelulosa, favoreciendo la separación de los componentes lignocelulósicos. A su vez, algunos solventes como el etanol, metanol y ácido acético pueden disolver la lignina y parte de la hemicelulosa, también con la finalidad de liberar azúcares solubles (Brodeur *et al.*, 2011). Asimismo, algunos agentes oxidantes, como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el ozono (O<sub>3</sub>), pueden disgregar los componentes de la matriz lignocelulósica, afectando su estructura química y disolviéndolos (Norrrahim *et al.*, 2021).

Por último, los pretratamientos biológicos se pueden llevar a cabo de dos maneras: por medio del crecimiento de microorganismos directamente en los sustratos lignocelulósicos o digiriéndolos mediante el uso de *cocktails* enzimáticos. Estos tratamientos presentan la ventaja de no generar compuestos tóxicos o inhibitorios, tales como los que se mencionaron. Los microorganismos aptos para efectuar el pretratamiento biológico de sustratos lignocelulósicos deben poseer la capacidad de degradar la celulosa y/o la lignina. Algunos de estos microorganismos son hongos filamentosos como los del género *Candida spp.* y *Aspergillus spp.*, y bacterias como *Bacillus spp.* y *Streptomyces spp.* Además, los microorganismos utilizados en estos tratamientos se pueden aplicar de manera aislada o en consorcios (Ummalyima *et al.*, 2019). Por otra parte, los *cocktails* enzimáticos para los pretratamientos biológicos consisten en mezclas de distintas enzimas hidrolíticas como celulasas y xilanasas, entre otras, las cuales hidrolizan enlaces específicos de los componentes de la matriz lignocelulósica liberando azúcares fermentables (Ballesteros, 2010). En la **Tabla 2** se indican los distintos pretratamientos de los sustratos lignocelulósicos y se detallan algunos ejemplos.

Pretratamientos de sustratos lignocelulósicos	Ejemplos
Físicos	Molienda, chipeado, irradiación con microondas y ultrasonido.
Fisicoquímicos	Explosión por vapor de agua, explosión con CO <sub>2</sub> y expansión de la fibra de amoníaco (AFEX).
Químicos	Hidrólisis ácida y alcalina, tratamiento con solventes orgánicos y agentes oxidativos.
Biológicos	Microorganismos y <i>cocktails</i> enzimáticos.

**Tabla 2. Pretratamientos de los sustratos lignocelulósicos.** Se detallan los distintos pretratamientos de la biomasa lignocelulósica y se indican ejemplos de estos. Tabla elaborada en base a los trabajos de Cheng *et al.* (2011), Lin *et al.* (2010), Jędrzejczyk *et al.* (2019), Harmsen *et al.* (2010), Brodeur *et al.* (2011), Norrrahim *et al.* (2021), Ummalyima *et al.* (2019) y Ballesteros (2010).

### 1.10. Inhibidores microbianos

Cuando se utiliza biomasa lignocelulósica como materia prima para el cultivo de microorganismos y la misma es sometida a pretratamientos químicos, como el tratamiento con ácido diluido, y fisicoquímicos, la formación de compuestos tóxicos o inhibidores microbianos representa una amenaza para los organismos productores de H<sub>2</sub>. En consecuencia, la eliminación o reducción de estas sustancias tóxicas es un paso necesario para conseguir un proceso de producción exitoso (Monlau *et al.*, 2014). Los compuestos inhibidores que se pueden generar durante dichos pretratamientos son (1) los derivados de furano, furfurales, que principalmente provienen de la transformación de pentosas y en menor proporción de hexosas, presentes en las fracciones de hemicelulosa y celulosa, (2) los compuestos fenólicos ligados a la degradación de la lignina, como la vanilina, y el siringaldehído, entre otros compuestos y (3) los ácidos carbónicos, como el ácido fórmico, ácido acético y ácido levulínico. La concentración de estos compuestos depende principalmente de las condiciones del pretratamiento, es decir, la temperatura, presión, tiempo de exposición, productos químicos utilizados y su concentración, así como también del origen y la composición de la materia prima lignocelulósica.

Los mecanismos de inhibición de estos compuestos tóxicos en el proceso de producción de hidrógeno se describen a continuación:

1. Los furfurales interfieren con la síntesis de enzimas glucolíticas y suprimen el crecimiento microbiano.
2. Los compuestos fenólicos influyen negativamente en las comunicaciones celulares y dañan las membranas celulares.
3. Las formas no dissociadas de los ácidos débiles penetran en las células microbianas por difusión y disminuyen el pH intracelular, lo que conduce a una disminución de la producción de hidrógeno (Quéméneur *et al.*, 2012).

Se ha reportado que, en cultivos de *Clostridium acetobutylicum* bajo el estrés de furfurales y compuestos fenólicos, se genera una disminución de enzimas y metabolitos involucrados en la glucólisis y el ciclo de Krebs, y en vías del proceso de producción de H<sub>2</sub> como la vía de síntesis de acetona-butanol y en el metabolismo redox (Liu *et al.* 2019). Por este motivo, el metabolismo de las bacterias productoras de hidrógeno puede cambiar significativamente con la presencia de inhibidores en el medio de cultivo.

Por tal motivo, en algunos casos es necesaria la remoción o disminución de estos compuestos tóxicos o inhibidores para permitir que ocurra la fermentación oscura, por lo que se presenta como necesario el tratamiento de los hidrolizados lignocelulósicos con procedimientos de detoxificación (Honarmandrad *et al.*, 2022).

En la **Tabla 3** se indican los distintos tipos de inhibidores microbianos generados durante los pretratamientos químicos y fisicoquímicos de la biomasa lignocelulósica, y además se detallan sus mecanismos de acción.

Inhibidores microbianos	Mecanismo de acción
Furfurales	Interfieren con la síntesis de enzimas glucolíticas y suprimen el crecimiento microbiano.
Compuestos fenólicos	Influyen negativamente en las comunicaciones celulares y dañan las membranas celulares.
Formas no disociadas de ácidos débiles	Ingresan a las células microbianas por difusión y disminuyen el pH intracelular, causando una disminución de la producción de hidrógeno.

**Tabla 3. Inhibidores microbianos y su mecanismo de acción.** Se indican los tipos de inhibidores microbianos o compuestos tóxicos generados durante los pretratamientos químicos y fisicoquímicos de la biomasa lignocelulósica, y sus mecanismos de acción. Tabla elaborada a partir de los trabajos de Quéméneur *et al.* (2012) y Liu *et al.* (2019)

### 1.11. Métodos de detoxificación de inhibidores microbianos

Se han propuesto diversas metodologías para eliminar o al menos disminuir los compuestos tóxicos o inhibidores microbianos presentes en hidrolizados químicos lignocelulósicos y así mitigar sus efectos negativos sobre el crecimiento de microorganismos y sus vías metabólicas. La detoxificación de los hidrolizados lignocelulósicos, obtenidos por medio de ciertos tratamientos como la hidrólisis ácida, puede llevarse a cabo mediante métodos físicos como el tratamiento con carbón activado y el uso de resinas de intercambio aniónico, métodos químicos como el *overliming* o sobrealcalinización y la aplicación de sulfitos, y mediante métodos biológicos como la implementación de ciertas enzimas como lacasas y el tratamiento con hongos filamentosos, entre otros (Zhang *et al.*, 2018).

En la **Tabla 4** se indican los distintos métodos de detoxificación que se pueden aplicar a los hidrolizados lignocelulósicos para eliminar o reducir compuestos tóxicos o inhibidores microbianos.

Debido a su bajo costo y su alta eficiencia en comparación con otros métodos de detoxificación, el método de sobrealcalinización u *overliming* y el tratamiento con carbón activado, son las metodologías más implementadas para conseguir disminuir o eliminar los distintos compuestos tóxicos presentes en hidrolizados químicos lignocelulósicos. Cabe destacar que estas dos metodologías pueden ser aplicadas de manera secuencial para aumentar la eficiencia de detoxificación de los hidrolizados (Chang *et al.*, 2011).

Métodos de detoxificación	Ejemplos
Físicos	Tratamiento con carbón activado Uso de resinas de intercambio aniónico
Químicos	<i>Overliming</i> o sobrealcalinización Aplicación de sulfitos
Biológicos	Implementación de lacasas Tratamiento con hongos filamentosos

**Tabla 4. Clasificación y ejemplos de los métodos de detoxificación de hidrolizados químicos lignocelulósicos.** Se indican los distintos métodos de detoxificación de hidrolizados químicos lignocelulósicos, y ejemplos de estos. Tabla elaborada en base a el trabajo de Zhang *et al.* (2018).

El método de sobrealcalinización u *overliming* consiste en la adición al hidrolizado lignocelulósico de un álcali, como ser  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  o  $\text{NaOH}$ , para aumentar su pH hasta un valor de 10 u 11, seguido de un ajuste del pH al valor adecuado de cultivo microbiano y posterior filtración para eliminar el material insoluble. Si este tratamiento se aplica sobre un hidrolizado lignocelulósico obtenido mediante hidrólisis con ácido sulfúrico diluido, se genera un precipitado de sulfato de calcio que debe ser eliminado. Esta metodología de detoxificación logra la disminución de la concentración de compuestos inhibidores en hidrolizados lignocelulósicos (Kordala *et al.*, 2023). Sin embargo, el mecanismo de detoxificación por *overliming* aún no ha sido completamente elucidado. Algunos autores sugieren que el efecto del *overliming* está meramente relacionado con la precipitación de sustancias tóxicas (Roberto *et al.*, 1991), mientras que otros consideran que se debe a la transformación química de los compuestos inhibidores que son inestables a valores de pH elevados (Millati *et al.*, 2002).

El tratamiento con carbón activado para eliminar compuestos tóxicos o inhibidores presentes en hidrolizados químicos lignocelulósicos es ampliamente utilizado debido a que se presenta como una técnica sencilla y económica (Sarawan *et al.*, 2019). El carbón activado se caracteriza por su gran área superficial, elevada microporosidad y capacidad de adsorción, lo cual lo convierte en un adsorbente efectivo, para procedimientos de detoxificación y purificación. (Arminda *et al.*, 2021). Su aplicación para la detoxificación de hidrolizados lignocelulósicos está ampliamente difundida debido a que el carbón activado posee baja afinidad por los azúcares (Parawira & Tekere, 2011) y es eficiente en la eliminación de furfurales y compuestos fenólicos (Kamal *et al.*, 2011).

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis

- 1) Es posible conseguir hidrolizados lignocelulósicos ricos en glucosa, pentosas y otros azúcares reductores mediante hidrólisis química de distintos sustratos residuales lignocelulósicos y seleccionar el más apto para su utilización en la producción de biohidrógeno mediante el proceso de fermentación oscura.
- 2) Es factible lograr la adaptación de un consorcio microbiano proveniente de un biodigestor, por medio de pasajes sucesivos en un medio de cultivo definido.
- 3) Es viable conseguir el crecimiento del consorcio microbiano y la producción de biohidrógeno a partir de hidrolizados lignocelulósicos mediante cultivos anaeróbicos en frascos *Erlenmeyer*.
- 4) Es posible realizar el escalado de la producción de biohidrógeno mediante fermentaciones anaeróbicas del consorcio microbiano utilizando un biorreactor de tanque agitado de laboratorio.

### 2.2. Objetivos

#### *Objetivo general:*

Llevar a cabo la optimización de la producción de hidrógeno biológico mediante fermentación anaeróbica de un consorcio microbiano a partir de hidrolizados químicos obtenidos de biomasa residual lignocelulósica.

#### *Objetivos específicos:*

- 1) Obtener hidrolizados lignocelulósicos ricos en glucosa, pentosas y otros azúcares reductores, mediante hidrólisis ácida de distintos sustratos lignocelulósicos residuales y seleccionar el más adecuado para su utilización en un proceso de producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura.
- 2) Realizar la adaptación de un consorcio microbiano, proveniente de un biodigestor de materia orgánica, por medio de pasajes sucesivos en un medio de cultivo definido.
- 3) Evaluar el crecimiento del consorcio microbiano mediante cultivos anaeróbicos en frascos *Erlenmeyer* con medio definido e hidrolizado lignocelulósico.
- 4) Analizar la producción de biohidrógeno por medio de cultivos anaeróbicos del consorcio microbiano en frascos *Erlenmeyer* con medio definido e hidrolizado lignocelulósico.
- 5) Llevar a cabo el escalado de la producción de biohidrógeno mediante fermentaciones anaeróbicas del consorcio microbiano en biorreactor de tanque agitado de laboratorio con medio definido e hidrolizado lignocelulósico.

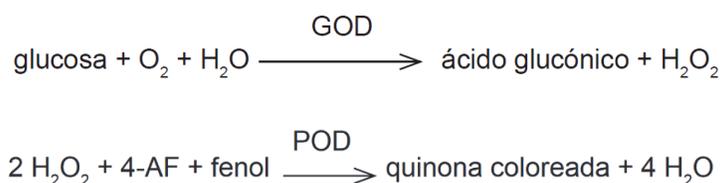
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Métodos analíticos de cuantificación

A continuación, se describen los métodos de cuantificación de glucosa, azúcares reductores, pentosas, furfurales y fenoles, utilizados para determinar su concentración en hidrolizados lignocelulósicos y en cultivos realizados en frascos *Erlenmeyer* y fermentaciones en biorreactor.

##### 3.1.1. Método de cuantificación de glucosa

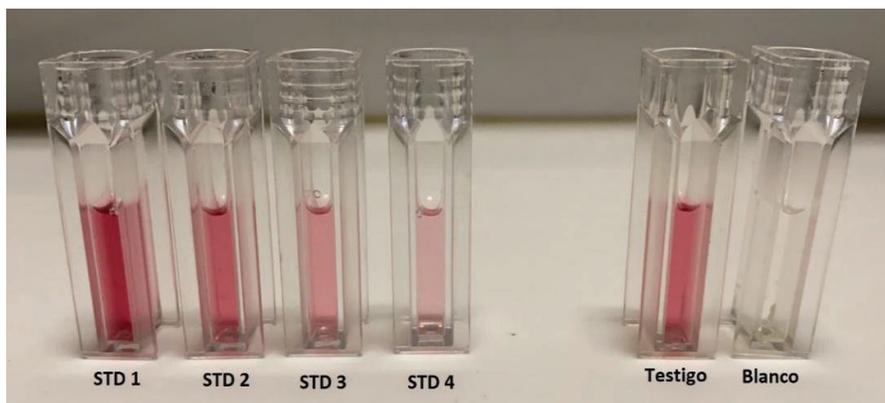
La cuantificación de glucosa se realizó aplicando el método enzimático de determinación de glicemia descrito por Henry (1974). Este método se basa en la formación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y ácido glucónico a partir de glucosa por acción de la enzima glucosa oxidasa (GOD). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado reacciona con aminofenazona (4-AF) y fenol para formar, por acción de la enzima peroxidasa (POD), quinona coloreada, la cual es cuantificable espectrofotométricamente a 505 nm (**Figura 8**). La intensidad del color generado es proporcional a la concentración de glucosa presente. Para esta cuantificación se utilizó el kit enzimático comercial de glicemia de *Wiener Lab*, compuesto por: Reactivo A (4-aminofenazona 25 mmol/L en Buffer Tris 0,92 mol/L), Reactivo B (fenol 55 mmol/L) y Reactivo C (glucosa oxidasa 1000 U/ml y peroxidasa 120 U/ml). El reactivo de trabajo se preparó mezclando 500 partes de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, 50 partes del reactivo A, 50 partes del reactivo B y llevando a 1000 partes con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, finalmente se agregaron 3 partes del reactivo C y se mezcló por inversión. Las siguientes soluciones estándar de glucosa (Merck®): 5 g/L; 2,5 g/L; 1,25 g/L y 0,625 g/L, se utilizaron para construir la curva de calibración. Además, se empleó como testigo o control de este método de cuantificación una solución de 2,5 g/L de glucosa (Baker®). Las muestras para analizar se evaluaron en una dilución tal que su concentración estuviese dentro del rango correspondiente a la linealidad de la curva de calibración. Las soluciones estándar de glucosa, la solución testigo y las diluciones de las muestras se realizaron con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Asimismo, se utilizó  $\text{H}_2\text{O}$  destilada como blanco de reacción de los estándares, solución testigo y muestras a analizar.



**Figura 8. Reacciones enzimáticas del método de cuantificación de glucosa.** Por medio de las reacciones indicadas se produce quinona coloreada, a partir de la glucosa, medible espectrofotométricamente a 505 nm (Henry, 1974).

Para llevar a cabo las reacciones se colocaron en tubos *Eppendorf*, 10  $\mu\text{L}$  de las soluciones detalladas anteriormente (estándares y testigo), muestras y  $\text{H}_2\text{O}$  destilada (blanco), se agregó 1 ml del reactivo de trabajo y se homogeneizó mediante *vortex*. Luego, se incubaron los tubos a 37°C en un baño de agua

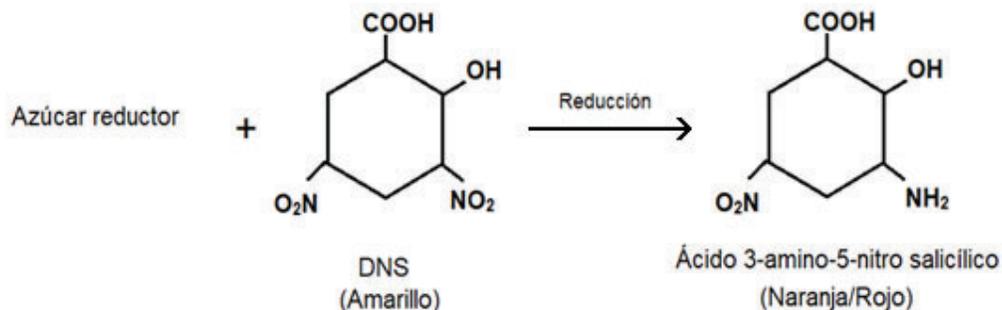
termostatzado (Vicking, modelo Masson Digital, Argentina) durante 10 min, y seguidamente, se trasvasó su contenido a cubetas para medir la absorbancia a 505 nm en espectrofotómetro (PG INSTRUMENTS®, modelo T60, Reino Unido). Las muestras, estándares, testigo y blanco se analizaron por duplicado. La **Figura 9** muestra las soluciones correspondientes a las distintas concentraciones del estándar, testigo y blanco de reacción, obtenidas luego de las reacciones químicas de este método de cuantificación.



**Figura 9. Soluciones correspondientes a la curva de calibración del método de cuantificación de glucosa.** Se muestran las soluciones luego de las reacciones a partir de las cuales se genera quinona coloreada. **STD**, corresponden a las concentraciones de las soluciones estándar de glucosa (STD 1: 5 g/L; STD 2: 2,5 g/L; STD 3: 1,25 g/L; STD 4: 0,625 g/L); **Testigo**, corresponde a la muestra control (solución de 2,5 g/L de glucosa); **Blanco**, corresponde al blanco de reacción (H<sub>2</sub>O destilada).

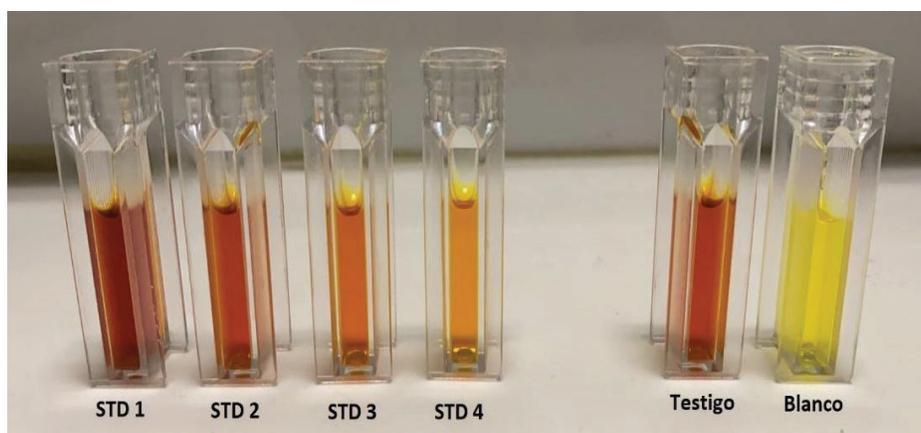
### 3.1.2. Método de cuantificación de azúcares reductores

La cuantificación de azúcares reductores se llevó a cabo aplicando el método colorimétrico descrito por Miller (1959), el cual se basa en la reacción entre los azúcares reductores y el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS, C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), donde se produce la reducción de este último a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), compuesto de color anaranjado cuantificable espectrofotométricamente a 570 nm (**Figura 10**).



**Figura 10. Reacción del método de cuantificación de azúcares reductores.** Reacción de reducción del ácido 3,5 dinitrosalicílico (compuesto de color amarillo) a ácido 3-amino-5-nitro salicílico (compuesto de color anaranjado a rojo), en presencia de azúcares reductores (Kang *et al.*, 2014).

El ensayo colorimétrico se llevó a cabo utilizando un reactivo de trabajo con la siguiente composición: 16 g/L de hidróxido de sodio (NaOH, 1 g/L de ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS  $C_7H_4N_2O_7$ ) y 300 g/L de tartrato de sodio y potasio ( $KNaC_4H_4O_6$ ) disueltos en  $H_2O$  destilada. Asimismo, partir de una solución estándar de glucosa (Merck®) se realizaron diluciones seriadas para obtener las siguientes concentraciones: 5 g/L; 2,5 g/L; 1,25 g/L y 0,625 g/L de glucosa, con las cuales se construyó la curva de calibración. Además, se empleó una solución testigo de glucosa de 2 g/L (Baker®) como control positivo del método de cuantificación. Las muestras a analizar se evaluaron en una dilución tal que su concentración estuviera dentro del rango de linealidad de la curva de calibración. También, se utilizó  $H_2O$  destilada como blanco de reacción de los estándares, testigo y muestras. Para efectuar las reacciones se colocaron en tubos *Eppendorf*, 200  $\mu$ L de las soluciones preparadas anteriormente (estándares y testigo), muestras y  $H_2O$  destilada (blanco). A continuación, en los tubos se agregó 1 ml del reactivo de trabajo, se agitaron con *vortex* y se incubaron a 100°C en baño termostatzado por 10 min (Vicking, modelo Masson Digital). Luego, los tubos se enfriaron en baño de agua, se trasvasó su contenido a cubetas y se midió la absorbancia a 570 nm en espectrofotómetro (PG INSTRUMENTS®, modelo T60). Los estándares, testigo y muestras se analizaron como mínimo por duplicado. En la **Figura 11** se muestran las soluciones correspondientes a las distintas concentraciones del estándar, testigo y blanco de reacción luego de la reacción química.

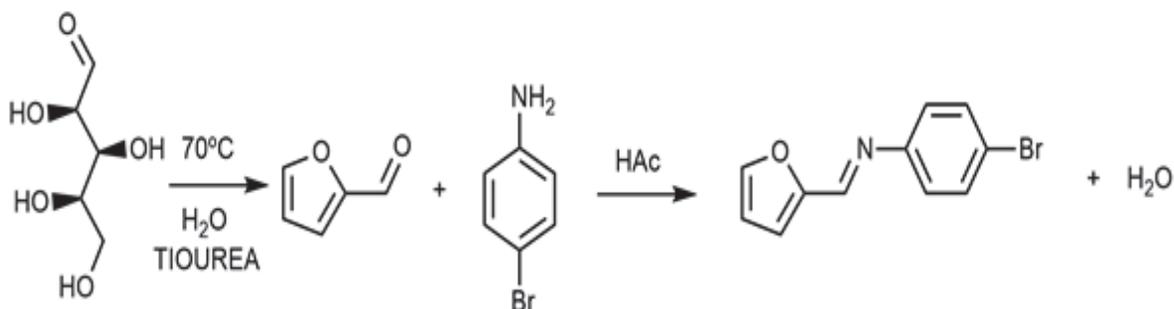


**Figura 11. Soluciones correspondientes a la curva de calibración del método de cuantificación de azúcares reductores.** Se muestran las soluciones obtenidas luego de las reacciones a partir de las cuales se obtiene el producto de color anaranjado. **STD**, corresponden a las concentraciones del estándar de glucosa (STD 1: 5 g/L; STD 2: 2,5 g/L; STD 3: 1,25 g/L; STD 4: 0,625 g/L); **Testigo**, corresponde a la muestra control (solución de 2 g/L de glucosa); **Blanco**, corresponde al blanco de reacción ( $H_2O$  destilada).

### 3.1.3. Método de cuantificación de pentosas y furfurales

La cuantificación de pentosas se realizó aplicando el método colorimétrico descrito por Deschatelets & Yu (1986), el cual se basa en la formación de furfurales a partir de pentosas en una solución de ácido acético

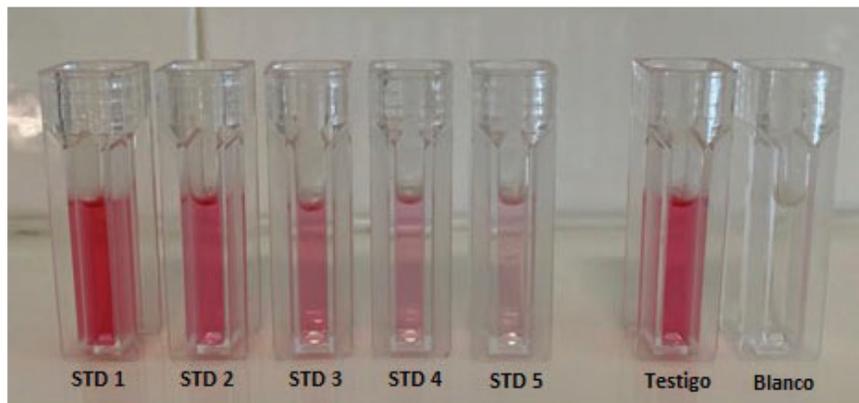
conteniendo tiourea a 70°C y en la reacción de los furfurales generados con acetato de bromoanilina, resultando en un producto de color rosado el cual es cuantificable espectrofotométricamente a 520 nm (Figura 12).



**Figura 12. Reacciones químicas del método de cuantificación de pentosas y furfurales.** Se detalla la conversión de pentosas a furfurales en presencia de ácido acético y tiourea a 70°C y su posterior reacción con acetato de bromoanilina para formar el producto coloreado.

El reactivo de trabajo se preparó diluyendo tiourea (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>S) en ácido acético glacial (CH<sub>3</sub>COOH) en una concentración de 40 g/L y luego agregando bromoanilina (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>BrN) en una concentración de 20 g/L. La curva de calibración se construyó con las siguientes concentraciones de una solución estándar de xilosa (Sigma-Aldrich®): 1 g/L, 0,5 g/L, 0,25 g/L, 0,125 g/L y 0,0625 g/L. Además, se utilizó una solución testigo de xilosa (Stanton®) de 0,5 g/L como control del método de cuantificación. Las muestras a analizar fueron diluidas tal que su concentración estuviera dentro del rango de linealidad de la curva de calibración de xilosa. Se utilizó H<sub>2</sub>O destilada como blanco de reacción de los estándares, testigo y muestras a analizar. Para llevar a cabo las reacciones se colocaron en tubos *Eppendorf*, 200 µL de las soluciones preparadas anteriormente (estándares y testigo), muestras y H<sub>2</sub>O destilada (blanco). Seguidamente, a cada tubo se le agregó 1 ml del reactivo de trabajo y se homogeneizó con *vortex*. Luego, los tubos se incubaron por 10 min a 70°C en baño termostático (Vicking, modelo Masson Digital), se enfriaron en baño de agua y finalmente se incubaron durante 70 min a temperatura ambiente en oscuridad. Luego, se trasvasó el contenido a cubetas y se midió la absorbancia a 520 nm en espectrofotómetro (PG INSTRUMENTS®, modelo T60). Las muestras, estándares y testigo se evaluaron como mínimo por duplicado. Para determinar la cantidad de furfurales presentes inicialmente en las muestras, se siguieron los mismos pasos descritos anteriormente, pero exceptuando la incubación a 70°C.

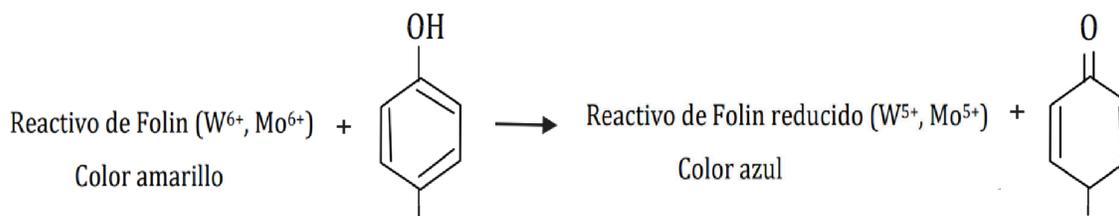
En la **Figura 13** se muestran las soluciones correspondientes a las concentraciones del estándar, testigo y blanco de reacción, luego de las reacciones químicas del método.



**Figura 13. Soluciones correspondientes a la curva de calibración del método de cuantificación de pentosas y furfurales.** Se muestran las soluciones obtenidas luego de las reacciones a partir de las cuales se obtiene el producto de color rosado. **STD**, corresponden a las concentraciones del estándar de xilosa (STD 1: 1 g/L, STD 2: 0,5 g/L; STD 3: 0,25 g/L; STD 4: 0,125 g/L; STD 5: 0,0625 g/L); **Testigo**, corresponde a la muestra control (solución de 0,5 g/L de xilosa); **Blanco**, corresponde al blanco de reacción (H<sub>2</sub>O destilada).

### 3.1.4. Método de cuantificación de fenoles

La cuantificación de fenoles se realizó mediante el método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*, aplicando un protocolo adaptado de Blainski *et al.* (2013). Esta metodología se basa en la reducción del reactivo de *Folin-Ciocalteu* en presencia de fenoles generando un producto de coloración azul cuantificable espectrofotométricamente (**Figura 14**).

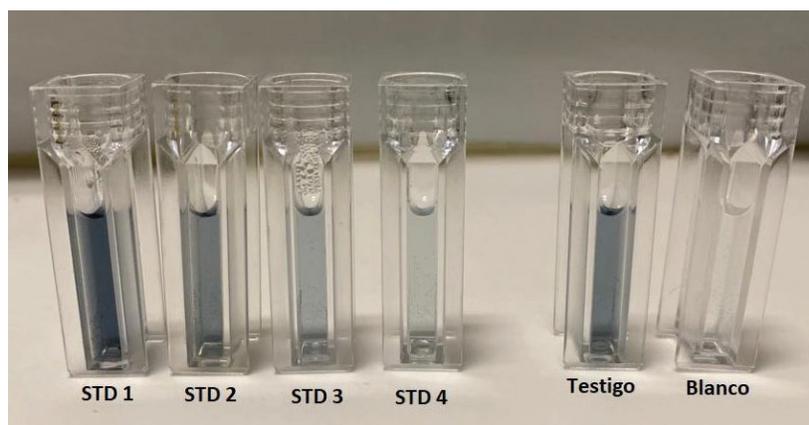


**Figura 14. Reacción química del método de cuantificación de fenoles.** Se detalla la reducción del ácido fosfomolibdotúngstico (coloración amarilla) del reactivo de *Folin-Ciocalteu*, por acción de un compuesto fenólico para generar un producto de coloración azul (Blainski *et al.*, 2013).

El reactivo de *Folin-Ciocalteu* contiene una mezcla de tungstato sódico (Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>) y molibdato sódico (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) en ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), los cuales reaccionan con los compuestos fenólicos. El ácido fosfomolibdotúngstico (coloración amarilla), formado a partir de dichas sales en el medio ácido, es reducido por los grupos fenólicos generando un complejo de color azul, cuya intensidad permite determinar la concentración de fenoles. La mencionada reacción es más rápida a pH básico, por este motivo la mezcla de reacción se ajusta a pH 10 con carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Blainski *et al.*, 2013).

La curva de calibración se realizó con las siguientes concentraciones de una solución estándar de fenol (Anedra®): 1 g/L; 0,5 g/L; 0,25 g/L y 0,125 g/L. Asimismo, se utilizó como control del método una solución testigo de fenol (Merck®) de 0,5 g/L y H<sub>2</sub>O destilada como blanco de reacción de los estándares, testigo y

muestras. Las muestras se analizaron en una dilución tal que su concentración estuviera en el rango de linealidad de la curva de calibración. Para llevar a cabo la reacción se colocaron en tubos *Eppendorf* 10  $\mu\text{L}$  de los estándares, muestras, testigo y blanco. Seguidamente, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  del reactivo de *Folin-Ciocalteu*, se mezclaron los tubos y después de 5 min se agregaron 900  $\mu\text{L}$  de una solución de carbonato de sodio de 30 g/L. Luego, los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min y, seguidamente, se transvasó el contenido a cubetas y se midió la absorbancia a 760 nm en espectrofotómetro (PG INSTRUMENTS®, modelo T60). Las muestras, estándares y testigo se analizaron como mínimo por duplicado. En la **Figura 15** se muestran las soluciones de las distintas concentraciones del estándar, testigo y blanco, luego de la reacción química.



**Figura 15. Soluciones correspondientes a la curva de calibración del método de cuantificación de fenoles.** Se muestran las soluciones obtenidas luego de la reacción de reducción del reactivo de *Folin-Ciocalteu*, a partir de la cual se obtiene el producto de color azul. **STD**, corresponden a las concentraciones del estándar de fenol (STD 1: 1 g/L; STD 2: 0,5 g/L; STD 3: 0,25 g/L; STD 4: 0,125 g/L); **Testigo**, corresponde a la muestra control (solución de 0,5 g/L de fenol); **Blanco**, corresponde al blanco de reacción ( $\text{H}_2\text{O}$  destilada).

### 3.2. Ensayo de linealidad de los métodos analíticos

La linealidad es la capacidad de un método de análisis de generar una respuesta proporcional, dentro de un determinado intervalo, a la cantidad de un analito que se analiza en una muestra. El rango lineal se determina mediante un gráfico de concentración del analito en función de la respuesta, el cual se construye a partir de distintas concentraciones del estándar correspondiente que cubran el intervalo de trabajo y un blanco de reacción (UNODC, 2010). El ensayo de linealidad se aplicó a las metodologías de cuantificación de glucosa, azúcares reductores, pentosas, furfurales y fenoles. Para tal fin, se realizaron, en diferentes días, curvas de calibración con las distintas concentraciones de los estándares correspondientes a cada método de cuantificación, evaluando los valores del coeficiente de correlación  $R^2$  correspondientes al ajuste lineal de las regresiones. Para esto, se prepararon distintas concentraciones de cada estándar, tal como se describió anteriormente para cada método cuantitativo, de forma tal de abarcar el rango lineal de

absorbancia del espectrofotómetro utilizado. Las soluciones de los estándares fueron analizadas aplicando los correspondientes métodos analíticos de cuantificación. Asimismo, para cada método de cuantificación se analizó una solución testigo de concentración conocida como control del método. El coeficiente de correlación  $R^2$  indica el grado de relación entre la variable de concentración (X) y la variable de respuesta (Y) de la curva de calibración y por ende es el criterio de aceptación cualitativo de la linealidad. Un valor máximo de 1 indica correlación positiva perfecta entre las variables X e Y, mientras que, un valor igual a 0 indica que no existe correlación alguna, es decir independencia total entre las variables. Así, para los distintos métodos de cuantificación utilizados se determinó el coeficiente  $R^2$  de las curvas de calibración y se evaluó una solución testigo.

### **3.3. Sustratos lignocelulósicos y consorcio microbiano**

Distintos sustratos lignocelulósicos fueron hidrolizados químicamente y evaluados en pos de seleccionar el sustrato más adecuado para ser utilizado como materia prima en la producción de hidrógeno biológico mediante fermentación. Los sustratos lignocelulósicos analizados fueron: cáscara de maní, cáscara de mandioca, bagazo de cervecería, hojas de maíz, cáscara de arroz, residuo de jojoba, residuos de poda municipal, de pino y de eucalipto. Estos sustratos lignocelulósicos fueron molidos utilizando un molinillo (Numak®, Modelo Fw-100, China) tal de obtener partículas pequeñas para aumentar la relación superficie/volumen del sustrato y favorecer su posterior hidrólisis química.

La producción de biohidrógeno mediante fermentación anaeróbica con hidrolizados lignocelulósicos y medio definido de Logan, se realizó utilizando un consorcio microbiano proveniente de un biodigestor de materia orgánica perteneciente a un buque de la Armada Argentina. Dicho consorcio microbiano, se compone principalmente de bacterias del género *Clostridium spp.* y *Sporolactobacillus spp.*, tal como ha reportado García *et al.* (2023). Previo a cada inoculación de hidrolizado lignocelulósico y medio definido de Logan, el consorcio microbiano se sometió a un tratamiento térmico a 75°C por 1h en baño termostático (Vicking, modelo Masson Digital), con el fin de conseguir el enriquecimiento del consorcio en los mencionados géneros y eliminar la presencia de bacterias metanogénicas consumidoras de hidrógeno (Chang *et al.*, 2011).

### **3.4. Hidrólisis química de sustratos lignocelulósicos**

Los sustratos lignocelulósicos detallados previamente fueron sometidos a un tratamiento de hidrólisis ácida con el fin de obtener hidrolizados lignocelulósicos ricos en azúcares fermentables. Dicho tratamiento de hidrólisis se realizó mezclando en botellas de vidrio autoclavables cada sustrato con una solución de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) diluida (2 N), en una relación sólido/líquido suficiente para embeber completamente el sustrato. Para los sustratos cáscara de maní, cáscara de mandioca, bagazo de cervecería, cáscara de arroz, residuo de jojoba y residuos de poda de eucalipto y de pino, la relación sólido/líquido fue 1:4, para hojas de

maíz fue 1:6 y para poda municipal fue 1:7. Las mezclas fueron sometidas a tratamiento térmico a 100°C durante 85 min en un autoclave eléctrico (BIOBASE, modelo BKM-P18, China). A continuación, las mezclas se filtraron utilizando lienzo de lino y luego papel de filtro Whatman® (General Electric Company, Grade 1, Estados Unidos), y posteriormente se ajustó el pH de los hidrolizados hasta un valor de 6 con perlas de hidróxido de sodio (NaOH), utilizando un pHmetro (Hanna®, modelo HI 9321, Estados Unidos). Los hidrolizados ácidos obtenidos a partir de los distintos sustratos lignocelulósicos fueron analizados mediante los métodos analíticos de cuantificación descritos previamente en la **Sección 3.1**, para determinar la concentración de los nutrientes: azúcares reductores, glucosa y pentosas, como así también la concentración de los inhibidores: furfurales y fenoles. Los valores de concentración de nutrientes e inhibidores en los hidrolizados se expresaron en gramos de compuesto por litro de hidrolizado (g/L) y también en gramos de compuesto cada 100 g de sustrato lignocelulósico seco (g/100 g sustrato seco). Esta última expresión indica la cantidad de cada compuesto independientemente de la relación sólido/líquido utilizada.

### **3.5. Análisis de aptitud de sustratos lignocelulósicos para la producción de biohidrógeno**

Con el objetivo de seleccionar un sustrato lignocelulósico adecuado para la obtención de hidrolizados lignocelulósicos ricos en azúcares para su utilización como medio de cultivo en la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura con un consorcio microbiano, se llevó a cabo un análisis de aptitud con los 9 sustratos lignocelulósicos mencionados previamente en la **Sección 3.3**. Para tal fin, se elaboró un sistema de puntajes considerando los siguientes criterios: concentración de nutrientes y compuestos tóxicos o inhibidores microbianos en los hidrolizados lignocelulósicos, disponibilidad de los sustratos lignocelulósicos, facilidad de almacenamiento y de transporte de los sustratos lignocelulósicos.

Para evaluar si la concentración de nutrientes en los hidrolizados lignocelulósicos presentaba un valor óptimo, se determinó la concentración de glucosa y pentosas en los distintos hidrolizados analizados. Se evaluó si dichos valores correspondían a concentraciones que favorecen la producción de hidrógeno por acción de los consorcios microbianos sin necesidad de concentrar o diluir los hidrolizados. Por lo tanto, se penalizó a los sustratos lignocelulósicos con un puntaje de -1 cuando correspondería realizar estos procedimientos de concentración o dilución, y se los calificó con un puntaje igual a 0 cuando no correspondería aplicarlos. Para esta calificación, se tuvo en cuenta que los solventes (acetona, etanol y butanol) producidos cuando la concentración de glucosa es de 10 a 30 g/L representan menos del 10 % de los productos solubles, mientras que con concentraciones de glucosa cercanas a 40 g/L, los mismos representan un 62 % de los productos solubles (Van Ginkel & Logan, 2005). Dichos solventes se generan como producto de la solventogénesis, una vía metabólica en la cual el rendimiento de producción de hidrógeno se encuentra usualmente reducido. Por este motivo, se busca evitar dicho metabolismo y

favorecer la acidogénesis, que corresponde a la vía metabólica a partir de la cual se produce hidrógeno con mayor rendimiento. Se consideró que los azúcares reductores que no son glucosa o pentosas corresponden en mayor medida a oligo o polisacáridos, por lo que no estarían inmediatamente disponibles para ser metabolizados y un exceso de estos no generaría un cambio metabólico de acidogénesis (metabolismo productor de hidrógeno) a solventogénesis.

Con respecto a los compuestos tóxicos o inhibidores microbianos presentes en los hidrolizados lignocelulósicos, se cuantificaron específicamente los furfurales y fenoles. Así, se penalizó a los sustratos lignocelulósicos con un puntaje de -0,5 cuando la concentración de furfurales superó los 2 g/L en el hidrolizado y con -1 cuando superó los 4 g/L, mientras que se calificó con un puntaje igual a 0 cuando la concentración fue menor a 2 g/L. Con respecto a los fenoles, se penalizó con -0,5 cuando la concentración de los mismos superó los 0,8 g/L en el hidrolizado y con -1 cuando superó los 1,5 g/L, mientras que se calificó con 0 cuando la concentración fue menor a 0,8 g/L. Dichos valores límites de concentración de furfurales y fenoles en los hidrolizados lignocelulósicos se establecieron en base a los trabajos de Akobi *et al.* (2016) y Tai *et al.* (2010), respectivamente.

Para el criterio de disponibilidad de cada sustrato lignocelulósico, se analizaron los siguientes dos aspectos. Por un lado, se analizó una posible aplicación alternativa del sustrato lignocelulósico, ya que en ese caso la producción de biohidrógeno a partir de dicho sustrato estaría compitiendo con otro uso. Por otro lado, se evaluó la oferta o abundancia de cada sustrato lignocelulósico en toneladas por año. Con relación al primer aspecto, la aplicación más importante que se le otorga a algunos sustratos es la de mantenerlos en el campo luego de la cosecha para que los nutrientes que poseen regresen al suelo bajo el sistema de siembra directa, como es el caso de la hoja de maíz (Perrachón, 2004). Así, la penalización de un sustrato por desvío de su aplicación habitual recibió un puntaje de -0,5. En este sentido, la cáscara de mandioca también fue penalizada porque generalmente se utiliza para la generación de biogás en las mismas plantas procesadoras del tubérculo (Denaday *et al.*, 2020). Con respecto al criterio de abundancia de cada sustrato, el puntaje consistió en una normalización de la cantidad (toneladas) de cada sustrato lignocelulósico disponible por año, según la siguiente fórmula:

$$\text{Abundancia normalizada} = (\text{Abundancia} - \text{MIN}(\text{abundancia})) / (\text{MAX}(\text{abundancia}) - \text{MIN}(\text{abundancia}))$$

Para dicha ecuación, la abundancia se expresa en toneladas de sustrato disponible por año. La expresión MIN(abundancia) corresponde a la menor abundancia de todos los sustratos analizados y MAX(abundancia) corresponde a la mayor abundancia de todos los sustratos analizados. La menor abundancia en toneladas por año fue la correspondiente a la cáscara de mandioca (22.000 toneladas/año) y la mayor abundancia fue la de la hoja de maíz (10.160.000 toneladas/año). El valor normalizado asigna un puntaje de 1 al sustrato

lignocelulósico de mayor abundancia y de 0 al de menor abundancia; mientras que al resto de los sustratos les corresponde un valor entre 0 y 1 según su valor relativo. Los valores de cantidad (toneladas) de sustrato disponible por año para las cáscaras de maní, arroz, mandioca y para los residuos de pino y eucalipto se obtuvieron del informe “Actualización del Balance de Biomasa con Fines Energéticos en la Argentina” de la FAO (Denaday *et al.*, 2020). Por otra parte, el valor de abundancia del bagazo de cervecería se obtuvo del informe “Bagazo de Cerveza: Un Subproducto con Múltiples Aplicaciones” del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (Baigorria, 2019). Asimismo, el valor de abundancia del sustrato hoja de maíz se consiguió de Manterola *et al.* (1999) y el del residuo de jobo se obtuvo de Díaz (1995) e InfoCampo (2021). Por último, el valor de abundancia del sustrato poda municipal se consiguió del trabajo de la empresa Lignis, en el cual se reportó la cantidad de dicho sustrato por año en la región central del país (Gauto Acosta *et al.*, 2021).

Para el criterio de almacenamiento de los sustratos, se consideró el costo de este procedimiento, que depende en gran medida del contenido de agua de cada sustrato lignocelulósico. Según el informe mencionado de la FAO (Denaday *et al.*, 2020), se considera biomasa lignocelulósica húmeda cuando el contenido de agua representa al menos el 60 % de su peso, de lo contrario es clasificado como biomasa seca. Solamente, el bagazo de cervecería superó este límite porcentual de todos los sustratos lignocelulósicos evaluados. Según el trabajo del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (Baigorria, 2019), para el almacenamiento y transporte del bagazo de cervecería es preciso un proceso de secado en horno o estufa, por este motivo se penalizó a este sustrato con un puntaje de -1. El resto de los sustratos lignocelulósicos no fueron penalizados para este criterio de almacenamiento (puntaje = 0).

Por último, para el criterio de transporte de los sustratos, se tuvo en cuenta la clasificación del Informe mencionado de la FAO respecto a la oferta directa e indirecta de los sustratos lignocelulósicos. Así, se define oferta directa de sustratos lignocelulósicos a la que está potencialmente disponible de manera dispersa en el terreno y oferta indirecta de sustratos a la que resulta de un proceso de transformación industrial. La característica de dispersión territorial de la oferta directa de sustratos encarece su costo de transporte, mientras que los sustratos de oferta indirecta se encuentran acumulados en establecimientos industriales, debido a que se obtienen como subproductos de procedimientos industriales. Como los sustratos lignocelulósicos son un recurso de baja cantidad de energía por unidad de masa, su transporte encarece considerablemente el proceso de producción de biohidrógeno, por lo tanto, los sustratos de oferta directa fueron penalizados con un puntaje de -1 y los de oferta indirecta fueron favorecidos con un puntaje de 1.

En la **Tabla 5** se resume el sistema de puntajes utilizado en el análisis de aptitud para la selección del sustrato lignocelulósico más adecuado para su utilización en la producción de biohidrógeno mediante el proceso de fermentación oscura con el consorcio microbiano.

Sistema de Puntajes			
Nutrientes (Glucosa+Pentosas)	Concentración óptima (10 a 30 g/L)		0
	Requiere procedimiento de concentración o dilución		-1
Inhibidores	Furfurales	Menor a 2 g/L	0
		Entre 2 g/L y 4 g/L	-0,5
		Mayor a 4 g/L	-1
	Fenoles	Menor a 0,8 g/L	0
		Entre 0,8 g/L y 1,5 g/L	-0,5
		Mayor a 1,5 g/L	-1
Disponibilidad	Desvío de la aplicación habitual	No	0
		Sí	-0,5
	Abundancia		Puntaje normalizado
Almacenamiento	Sustrato húmedo		-1
	Sustrato seco		0
Transporte	Oferta directa del sustrato		-1
	Oferta indirecta del sustrato		1

**Tabla 5. Sistema de puntajes implementado en el análisis de aptitud.** El análisis de aptitud se aplicó para la selección del sustrato lignocelulósico más adecuado para la obtención de hidrolizados lignocelulósicos aptos para la producción de hidrógeno mediante fermentación oscura. Los criterios evaluados fueron concentración de nutrientes e inhibidores en los hidrolizados lignocelulósicos, disponibilidad, almacenamiento y transporte de los sustratos lignocelulósicos.

Finalmente, a partir el sustrato lignocelulósico seleccionado se calculó el porcentaje de conversión de celulosa y hemicelulosa a azúcares simples, para lo cual se aplicaron las siguientes fórmulas que fueron reportadas por Sluiter *et al.*, 2008.

$$\% \text{ Conversión Celulosa} = \frac{C_{FG} \text{ (g/L)}}{C_{PG} \text{ (g/L)} \times FC_{Glucosa}} \times 100$$

$$\% \text{ Conversión Hemicelulosa} = \frac{C_{FP} \text{ (g/L)}}{C_{PP} \text{ (g/L)} \times FC_{Pentosas}} \times 100$$

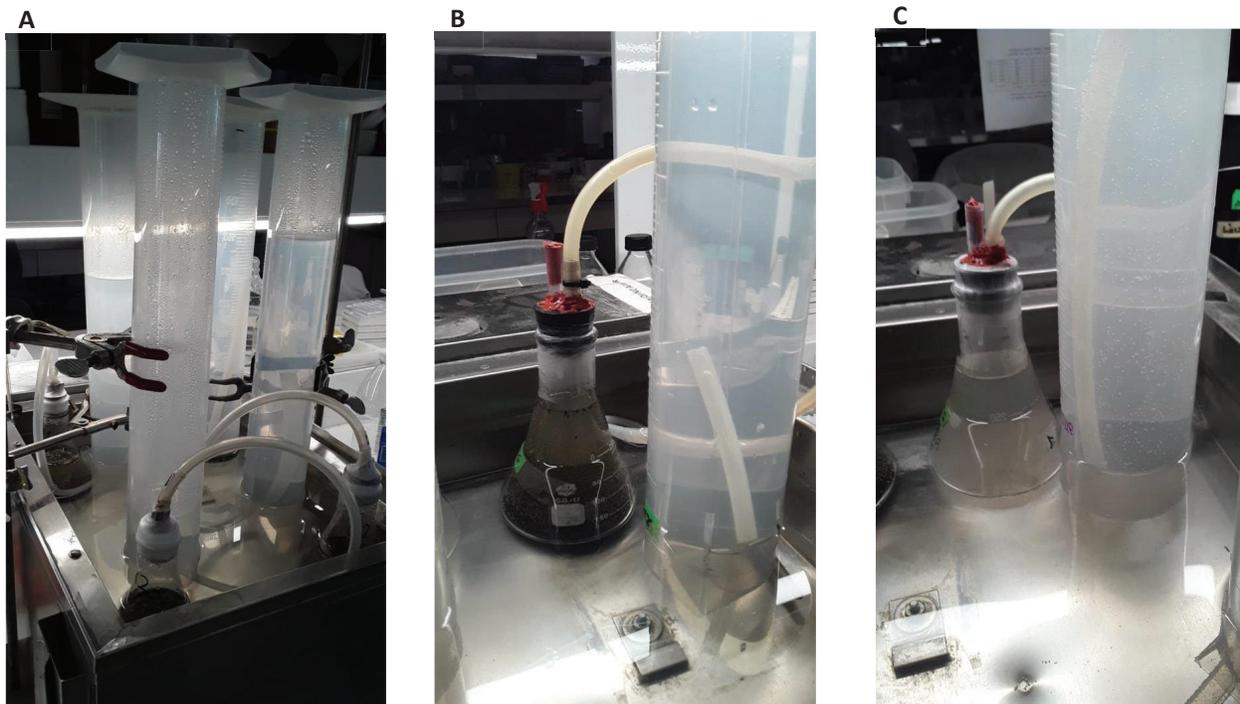
Donde  $C_{FG}$  y  $C_{FP}$  corresponden a la concentración final de glucosa y pentosas, respectivamente, obtenidas luego del proceso de hidrólisis del sustrato lignocelulósico.  $C_{PG}$  y  $C_{PP}$  corresponden a la concentración potencial máxima de glucosa y pentosas, respectivamente, que se podrían obtener a partir del sustrato lignocelulósico. FC es el factor de corrección por hidratación entre el monómero libre y cuando se encuentra formando parte del polímero, cuyos valores son  $FC_{Glucosa}=1,10$  y  $FC_{Pentosas}=1,12$ . Los valores de concentración potencial máxima de glucosa y pentosas de la cáscara de arroz, 157,5 g/L y 112,5 g/L, respectivamente, utilizados para calcular los porcentajes de conversión, corresponden a los reportados por Ugheoke (2012).

### 3.6. Adaptación del consorcio microbiano a un medio definido mediante pasajes sucesivos

Con el fin de conseguir la adaptación del consorcio microbiano proveniente de un biodigestor de materia orgánica, se realizaron pasajes o repiques sucesivos en el medio de cultivo definido diseñado por Logan *et al.* (2002). El medio definido de Logan presenta la siguiente composición: 2 g/L de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ; 1 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mg/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 10 mg/L de  $\text{NaCl}$ ; 10 mg/L de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 10 mg/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 15 mg/L de  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2,78 mg/L de  $\text{FeCl}_2$ ; 10,66 g/L de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico monohidrato (MES) como buffer y 15 g/L de glucosa como fuente de carbono. Los pasajes sucesivos del consorcio microbiano se realizaron con el objetivo de lograr la adaptación del consorcio microbiano a dicho medio de cultivo definido y además eliminar la materia orgánica e impurezas presentes en el líquido proveniente del biodigestor. Así, a partir del consorcio microbiano pretratado térmicamente, se realizaron pasajes o repiques sucesivos cada 3 o 4 días en el medio de cultivo definido de Logan contenido en frascos *Erlenmeyer* de 100 ml. Los repiques sucesivos se efectuaron al 10 % y 20 % (v/v) en medio definido de Logan, evaluando cada concentración por duplicado. Los cultivos de los repiques se llevaron a cabo a volumen completo de los frascos *Erlenmeyer* y sin agitación para generar condiciones anaeróbicas, e incubando los frascos a 37°C en baño termostatzado (*Precision Scientific Inc.*®, Estados Unidos). Se tomaron muestras de los cultivos en una cabina de seguridad biológica cada 24 h, para luego determinar la densidad óptica a 600 nm ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) mediante espectrofotómetro (PG INSTRUMENTS®, modelo T60). Una vez obtenidos cultivos sin restos apreciables de materia orgánica, se procedió a evaluar su capacidad de producción de biohidrógeno comparándolo con cultivos inoculados con el consorcio microbiano original, es decir, sin haberle realizado los repiques sucesivos.

### 3.7. Producción de biohidrógeno con el consorcio microbiano original y el proveniente de repiques

A partir de cultivos del consorcio microbiano proveniente de repiques sucesivos, se evaluó el crecimiento y la producción de biohidrógeno en comparación con cultivos del consorcio microbiano original. Dichos cultivos se realizaron en frascos *Erlenmeyer* de 250 ml conteniendo medio definido de Logan. Los frascos se conectaron, a través de mangueras de silicona, a probetas invertidas de 1 L conteniendo agua, conformando así el sistema hidroneumático para la recolección y cuantificación del biogás generado por los cultivos, tal como se muestra en la **Figura 16**. Cabe aclarar que, los cultivos del consorcio original y del consorcio proveniente de los repiques se llevaron a cabo de manera simultánea en el medio de Logan.



**Figura 16. Sistema hidroneumático para evaluación de la producción de hidrógeno mediante cultivos del consorcio microbiano proveniente de repiques sucesivos en comparación con cultivos del consorcio microbiano original.** A: Sistema hidroneumático completo conformado por cultivos en frascos *Erlenmeyer* en un baño termostatzado y conectados a través de mangueras de silicona a probetas invertidas completas con agua para la recolección de gas, B: Detalle del sistema hidroneumático para la recolección del gas producido por un cultivo del consorcio original, C: Detalle del sistema hidroneumático para la recolección del gas producido por un cultivo del consorcio proveniente de repiques sucesivos.

Los cultivos se realizaron a volumen completo de los frascos *Erlenmeyer* y sin agitación para generar condiciones anaeróbicas adecuadas. La inoculación se realizó al 20 % (v/v) ya sea con el consorcio original como con el consorcio proveniente de repiques. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 72 h en un baño termostatzado (*Precision Scientific Inc.*®, Estados Unidos). Cada 24 h de incubación se determinó el volumen de gas generado (litros) a partir de cada uno de los cultivos. Al final de la incubación, se determinó, a partir del gas total generado por cada cultivo, la cantidad de biohidrógeno producido, utilizando una pila de combustible tipo PEM (Horizon, modelo FCSU-012-1, República Checa). La pila tipo PEM genera corriente eléctrica a partir de hidrógeno, por lo que la misma se conectó a un medidor de corriente eléctrica (amperímetro). Así, por medio del amperímetro se registró la corriente (miliamperios) generada por la pila PEM cada intervalos de 15 seg y se registró también el tiempo durante el cual se observó corriente (tiempo de reacción). La cantidad de hidrógeno en el gas analizado se determinó a partir del producto entre el promedio de la corriente eléctrica generada y el tiempo de reacción, cuyo valor es directamente proporcional a la concentración del hidrógeno presente en las muestras de gas, por lo cual se utilizó la siguiente ecuación para calcular la cantidad de hidrógeno producido:

$$\eta_{H_2} = \frac{I_p * t_r}{2F}$$

Donde  $\eta_{H_2}$  es la cantidad de moles de hidrógeno (mmoles);  $I_p$  es la corriente promedio generada por la pila medida en miliamperes (mA);  $t_r$  es el tiempo de reacción medido en segundos (s);  $F$  es la constante de Faraday en milicoulombs por milimoles (96.485 mC/mmol) multiplicada por la cantidad de electrones (dos) que se transfieren a partir de la oxidación de una molécula de hidrógeno.

Asimismo, se calculó del porcentaje de hidrógeno en el biogás generado aplicando la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{mmol } H_2 * 24,42 \text{ ml/mmol}}{V_m} * 100 = \% \text{ de } H_2 \text{ en el biogás}$$

Donde 24,42 ml/mmol corresponde al volumen que ocupa un milimol de un gas en condiciones normales de presión y temperatura (298,15 K, 1 atm) y  $V_m$  es el volumen de la muestra de biogás tomada para realizar la cuantificación de hidrógeno.

A partir de la cantidad de hidrógeno producido se calcularon los siguientes parámetros: concentración de hidrógeno producido por litro de cultivo (mg de  $H_2$ /L cultivo), rendimiento de hidrógeno producido en función de los azúcares fermentables consumidos (mg  $H_2$ /g azúcares fermentables), productividad volumétrica (mg  $H_2$ /Lh) y productividad volumétrica total de hidrógeno (mg  $H_2$ /h).

Además, muestras correspondientes a los cultivos al inicio y al final de la incubación fueron centrifugadas a 8000 rpm durante 10 min utilizando una microcentrífuga (Eppendorf, modelo 5415 R, Alemania) y a partir de los sobrenadantes se determinó la concentración de azúcares reductores, glucosa, pentosas y furfurales, mediante los métodos descritos previamente. Asimismo, se determinó el pH de los cultivos al inicio y al final del período de incubación utilizando tiras reactivas (Merck, modelo MQuant, Alemania).

### **3.8. Evaluación de crecimiento del consorcio microbiano en medio definido con distintas fuentes de carbono**

La evaluación del crecimiento del consorcio microbiano proveniente del biodigestor se llevó a cabo mediante cultivos en medio definido de Logan con las siguientes fuentes de carbono: glucosa (15 g/L), xilosa (15 g/L) y una mezcla de glucosa (7,5 g/L) y xilosa (7,5 g/L), evaluando cada condición por triplicado. Los cultivos se realizaron en frascos *Erlenmeyer* de 100 ml a volumen completo y sin agitación para generar las condiciones anaeróbicas adecuadas. La inoculación se realizó al 20 % (v/v) con el consorcio microbiano pretratado térmicamente, y los cultivos se incubaron a 37°C durante 96 h en un baño termostatzado (*Precision Scientific Inc.*<sup>®</sup>). Se tomaron muestras de los distintos cultivos a tiempo inicial y cada 24 h, las cuales fueron centrifugadas a 8000 rpm durante 10 min con microcentrífuga (Eppendorf, modelo 5415 R). A partir de los

sobrenadantes de las muestras centrifugadas se determinó la concentración de azúcares reductores, glucosa, pentosas y furfurales, aplicando los métodos descritos previamente. Asimismo, se midió el pH de las muestras a los tiempos 0 h, 24 h, 48 h y 72 h utilizando tiras reactivas (Merck, Modelo MQuant, Alemania) y a tiempo final (96 h) con un pHmetro (Hanna®, modelo HI 9321).

### **3.9. Evaluación de crecimiento del consorcio microbiano en hidrolizados de cáscara de arroz**

Se evaluó el crecimiento del consorcio microbiano mediante cultivos en frascos *Erlenmeyer* con distintas concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz en medio definido de Logan. Para tal fin, en una primera instancia se llevó a cabo el crecimiento del consorcio bacteriano en hidrolizado al 25 % (v/v) de concentración en medio de Logan y en hidrolizado puro (100 % v/v), y en una segunda instancia en hidrolizado al 50 % y 75 % (v/v) en medio de Logan. Asimismo, se efectuaron cultivos del consorcio microbiano en medio definido de Logan puro, como control experimental. Cada concentración de hidrolizado de cáscara de arroz como así también el control fueron evaluados por duplicado. Los cultivos se llevaron a cabo en frascos *Erlenmeyer* de 100 ml, a volumen completo y sin agitación para generar condiciones anaeróbicas apropiadas. La inoculación de los frascos *Erlenmeyer* conteniendo las distintas concentraciones de hidrolizado y el control, se efectuó al 20 % (v/v) con el consorcio microbiano pretratado térmicamente, y los cultivos se incubaron a 37°C durante 96 h en baño termostatzado (*Precision Scientific Inc.*®). Se tomaron muestras de los cultivos a tiempo inicial y cada 24 h, las cuales fueron centrifugadas a 8000 rpm durante 10 min con microcentrífuga (Eppendorf, modelo 5415 R). A partir de los sobrenadantes de las muestras, se determinó la concentración de azúcares reductores, glucosa, pentosas y furfurales, mediante los métodos detallados previamente. Asimismo, se midió el pH de las muestras a los tiempos 0 h, 24 h, 48 h y 72 h de incubación mediante tiras reactivas (Merck, Modelo Mquant) y a tiempo final (96 h) con pHmetro (Hanna®, modelo HI 9321).

### **3.10. Detoxificación del hidrolizado lignocelulósico de cáscara de arroz**

La detoxificación del hidrolizado de cáscara de arroz, en pos de disminuir la concentración de inhibidores microbianos como furfurales y fenoles, se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por Chang *et al.* (2011). El mismo consistió en una primera etapa de *overliming* o sobrealcalinización con Ca(OH)<sub>2</sub> y una segunda etapa de tratamiento con carbón activado. La etapa de *overliming* implicó ajustar el pH del hidrolizado hasta un valor de 11 con Ca(OH)<sub>2</sub> utilizando un pHmetro (Hanna®, modelo HI 9321) y luego se agitó el hidrolizado por 1 h a 200 rpm con un agitador magnético (DLAB, modelo MS7-H550-S, China). Una vez finalizada la etapa de *overliming*, se ajustó el pH del hidrolizado hasta 6 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizando también pHmetro (Hanna®, modelo HI 9321) y se realizó una filtración con lienzo de lino para eliminar el precipitado. Luego, se agregó carbón activado al hidrolizado hasta una concentración final de 1,5 % (p/v) y se procedió nuevamente a su agitación a 200 rpm durante 1 h con agitador magnético (DLAB, MS7-H550-S).

Posteriormente, se efectuó la filtración del hidrolizado con papel de filtro Whatman® (General Electric Company, Grade 1). Finalmente, se llevó a cabo la pasteurización del hidrolizado detoxificado a 65°C por 30 min en baño termostatzado (Vicking, modelo Masson Digital), con el fin de disminuir su posible carga microbiana. Se tomaron muestras del hidrolizado lignocelulósico antes y después de cada etapa del procedimiento de detoxificación, con el fin de determinar la concentración de furfurales y fenoles. De esta manera, se evaluó la efectividad del proceso de detoxificación en la reducción de la concentración de dichos inhibidores en el hidrolizado de cáscara de arroz. Asimismo, a partir de las muestras se determinó la concentración de azúcares reductores, glucosa y pentosas con el fin de evaluar la posible disminución de estos componentes en el hidrolizado durante la detoxificación. Además, se llevó a cabo la cuantificación de dichos inhibidores y nutrientes luego de la pasteurización del hidrolizado para evaluar si este proceso afectó sus concentraciones.

### **3.11. Ensayos de crecimiento y producción de hidrógeno a escala *Erlenmeyer***

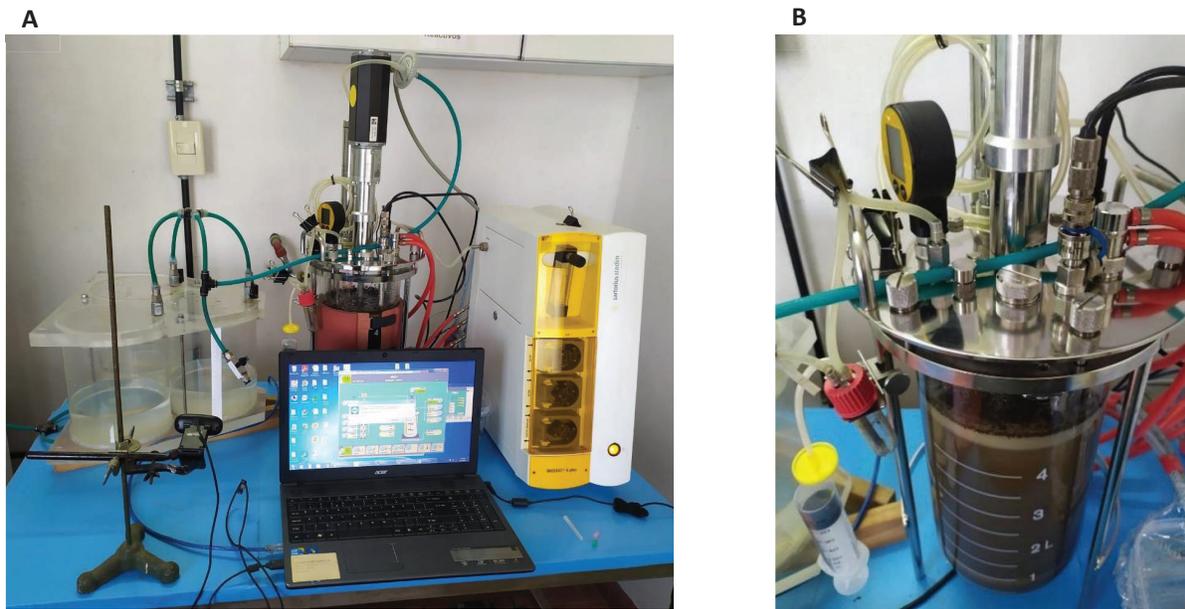
El crecimiento y producción de biohidrógeno se evaluó mediante cultivos anaeróbicos del consorcio microbiano en frascos *Erlenmeyer*, conteniendo hidrolizado de cáscara de arroz diluido con medio definido de Logan al 25 %, 50 %, 75 % (v/v) e hidrolizado puro (100 % v/v), evaluando cada concentración por triplicado. Se utilizó hidrolizado de cáscara de arroz detoxificado para las concentraciones de 50 %, 75 % y 100 % (v/v) e hidrolizado sin detoxificar para la concentración de 25 % (v/v). También se llevaron a cabo cultivos en medio definido de Logan puro como control de la producción de hidrógeno. Los cultivos se efectuaron en frascos *Erlenmeyer* de 250 ml a volumen completo y sin agitación para generar las condiciones anaeróbicas apropiadas. La inoculación de los frascos *Erlenmeyer* conteniendo las distintas concentraciones de hidrolizado y el control se realizó al 20 % (v/v) con el consorcio microbiano pretratado térmicamente. Los frascos *Erlenmeyer* se conectaron, a través de mangueras de silicona, a probetas invertidas de 1 L conteniendo H<sub>2</sub>O (sistema hidroneumático), tal como se describió previamente, en pos de coleccionar y cuantificar el gas generado mediante los cultivos. Los distintos cultivos se incubaron a 37°C durante 72 h en baño termostatzado (*Precision Scientific Inc.*®). Cada 24 h de incubación se cuantificó el volumen de gas generado a partir de los cultivos. Asimismo, al final de la incubación se cuantificó el hidrógeno a partir del gas generado por los distintos cultivos, utilizando la pila de combustible tipo PEM (Horizon, modelo FCSU-012-1), conectada a un amperímetro. Para tal fin, se cuantificó la corriente eléctrica generada a partir del gas, para luego calcular la cantidad de H<sub>2</sub> en el gas analizado tal como se detalló previamente. Además, muestras de los cultivos correspondientes al inicio y al final de la incubación fueron centrifugadas a 8000 rpm durante 10 min con microcentrífuga (Eppendorf, modelo 5415 R) y a partir de los sobrenadantes se determinó la concentración de azúcares reductores, glucosa, pentosas y furfurales. Asimismo, se determinó el pH de los cultivos, al inicio del período de incubación, con tiras reactivas (Merck, Modelo Mquant) y al

final de la incubación con pHmetro (Hanna®, modelo HI 9321). A partir de la cantidad de hidrógeno producido se calcularon los siguientes parámetros de producción: concentración de hidrógeno (mg H<sub>2</sub>/L cultivo), productividad volumétrica (mg H<sub>2</sub>/Lh), productividad total (mg H<sub>2</sub>/h), y el rendimiento de hidrógeno respecto a los azúcares reductores consumidos (mg H<sub>2</sub>/g azúcares reductores). Asimismo, para los cultivos en hidrolizados lignocelulósicos se calculó el rendimiento de hidrógeno respecto a los gramos de sustrato lignocelulósico utilizados para obtener cada hidrolizado (mg H<sub>2</sub>/g sustrato).

### **3.12. Producción de hidrógeno mediante fermentaciones a escala biorreactor de 5 L**

El escalado de la producción de biohidrógeno se llevó a cabo mediante fermentaciones del consorcio microbiano en un biorreactor de tanque agitado de 5 L (Sartorius®, BIOSTAT A plus, Alemania). Para tal fin, se realizó una fermentación en dicho biorreactor con 4 L de hidrolizado de cáscara de arroz detoxificado sin diluir (100 % de hidrolizado detoxificado). Asimismo, se efectuó una fermentación utilizando el medio definido de Logan (4 L) como control del proceso de producción. La inoculación tanto del hidrolizado como del medio de Logan se realizó al 20 % (v/v) con el consorcio microbiano pretratado térmicamente. Con el objetivo de generar las condiciones anaeróbicas adecuadas, antes de la inoculación se aplicó un flujo de N<sub>2</sub> gaseoso por 5 min para desplazar el O<sub>2</sub> disuelto en el medio (0 % de O<sub>2</sub> disuelto), en base a lo indicado por Martínez *et al.*, (2022), y además las fermentaciones se realizaron a volumen completo del biorreactor. Asimismo, durante las fermentaciones se aplicó una agitación de 50 rpm para asegurar una mezcla adecuada del contenido del biorreactor sin dañar los microorganismos. La temperatura de los cultivos se mantuvo constante en 37°C durante las fermentaciones, mientras que el pH se dejó variar durante el proceso fermentativo según el metabolismo del consorcio, partiendo de un valor de 6. La salida de gases del biorreactor (venteo) se conectó, mediante una manguera de silicona, a un reservorio de acrílico compuesto por 3 contenedores de 4,8 L cada uno, graduados con una escala milimetrada y completos con agua, para el almacenamiento y cuantificación del gas producido durante las fermentaciones, mediante el desplazamiento del agua. Las fermentaciones se llevaron a cabo hasta las 72 h de proceso, registrando el volumen de gas producido cada 24 h. Asimismo, se tomaron muestras de cultivo a tiempo inicial y cada 24 h de fermentación. Las muestras se centrifugaron con microcentrífuga (Eppendorf, modelo 5415 C) a 8000 rpm durante 10 min y a partir de los sobrenadantes se determinó por duplicado la concentración de azúcares reductores, glucosa, pentosas y furfurales, mediante los métodos descritos previamente. A su vez, se determinó el pH de estas muestras mediante pHmetro (Hanna®, HI 9321). A partir del biogás colectado se cuantificó el biohidrógeno producido por medio de la pila tipo PEM (HORIZON, modelo FCSU-012-1), a las 48 h y 72 h de fermentación, tal como se describió previamente. Además, a partir de la cantidad de hidrógeno cuantificado se determinaron los siguientes parámetros de proceso: concentración de hidrógeno (mg H<sub>2</sub>/L cultivo), productividad volumétrica (mg H<sub>2</sub>/L h), productividad total (mg H<sub>2</sub>/h) y rendimiento de hidrógeno respecto

a los azúcares reductores consumidos ( $\text{mg H}_2/\text{g}$  azúcares reductores). Asimismo, para la fermentación en hidrolizado lignocelulósico se calculó el rendimiento de hidrógeno respecto a los gramos de sustrato lignocelulósico utilizados para obtener el hidrolizado ( $\text{mg H}_2/\text{g}$  sustrato). En la **Figura 17** se muestra el sistema completo utilizado para las fermentaciones anaeróbicas del consorcio microbiano, el cual se conformó por el biorreactor de tanque agitado de 5 L (Sartorius®, BIOSTAT A plus) conectado al reservorio para el almacenamiento de gas y a una computadora portátil para el monitoreo del proceso y registro de datos. Este equipamiento pertenece a la División de Investigación y Desarrollo en Energías Renovables (DIDER) del Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas para la Defensa (CITEDEF).

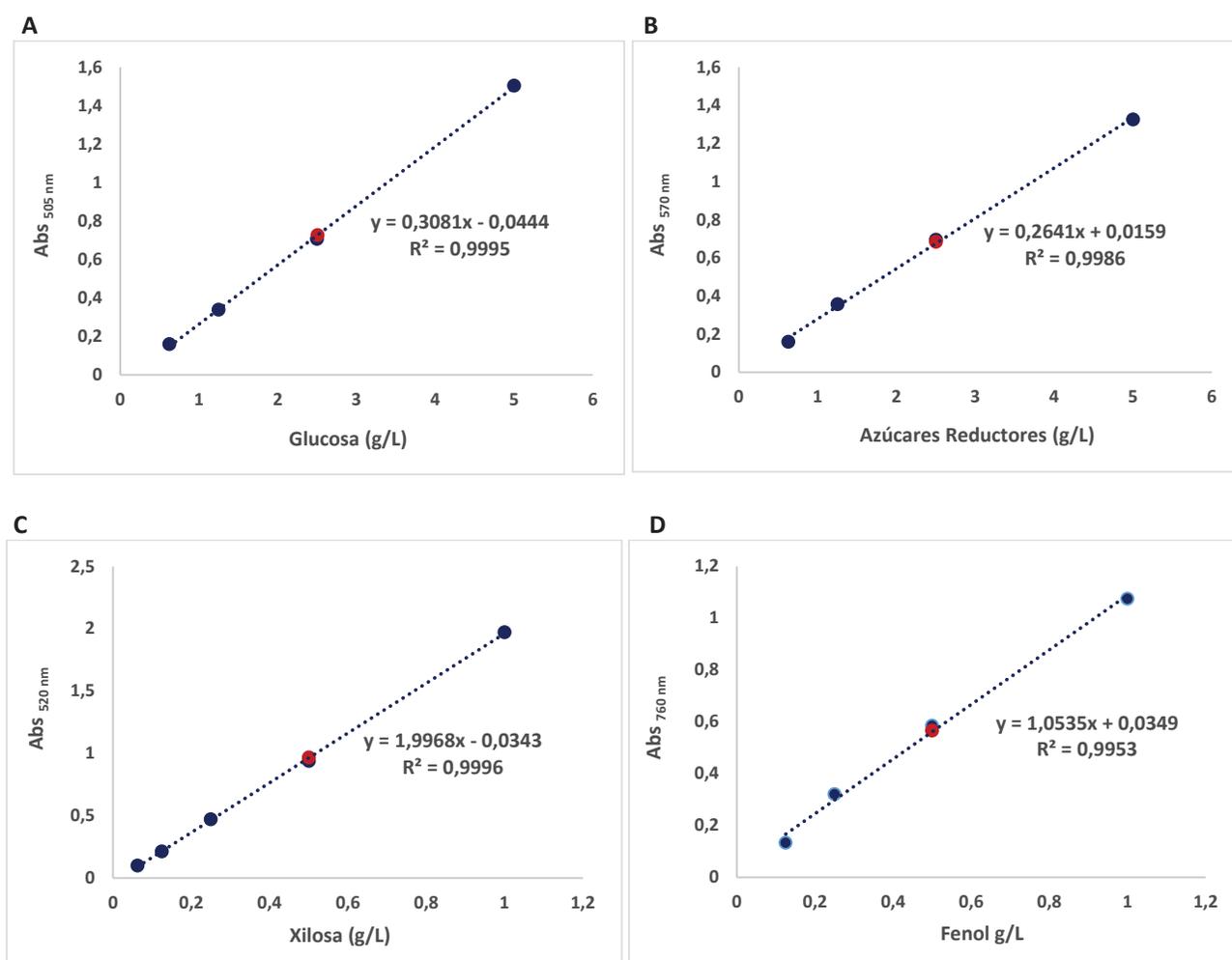


**Figura 17. Biorreactor de tanque agitado utilizado para realizar las fermentaciones anaeróbicas.** Configuración del sistema completo empleado para las fermentaciones anaeróbicas del consorcio microbiano. **A:** Sistema completo conformado por el biorreactor de tanque agitado de 5 L conectado al reservorio para almacenamiento de gas y a una computadora portátil para el monitoreo del proceso y registro de datos, **B:** Detalle del biorreactor de tanque agitado, donde se puede observar el manómetro, toma-muestra, y sensores, entre otros componentes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Ensayo de linealidad de los métodos analíticos

Los métodos de cuantificación de glucosa, azúcares reductores, pentosas y furfurales, y fenoles fueron evaluados mediante el ensayo de Linealidad, obteniendo las correspondientes curvas de calibración que se muestran en la **Figura 18**. Así, a partir del ensayo de Linealidad aplicado a cada método de cuantificación, se obtuvo la correspondiente ecuación de la recta y el valor del coeficiente de correlación  $R^2$ , dentro del rango de las concentraciones evaluadas de los respectivos estándares. Asimismo, para cada curva de calibración obtenida se determinó el valor de absorbancia correspondiente a una solución testigo de concentración conocida, utilizada como control de cada método de cuantificación.



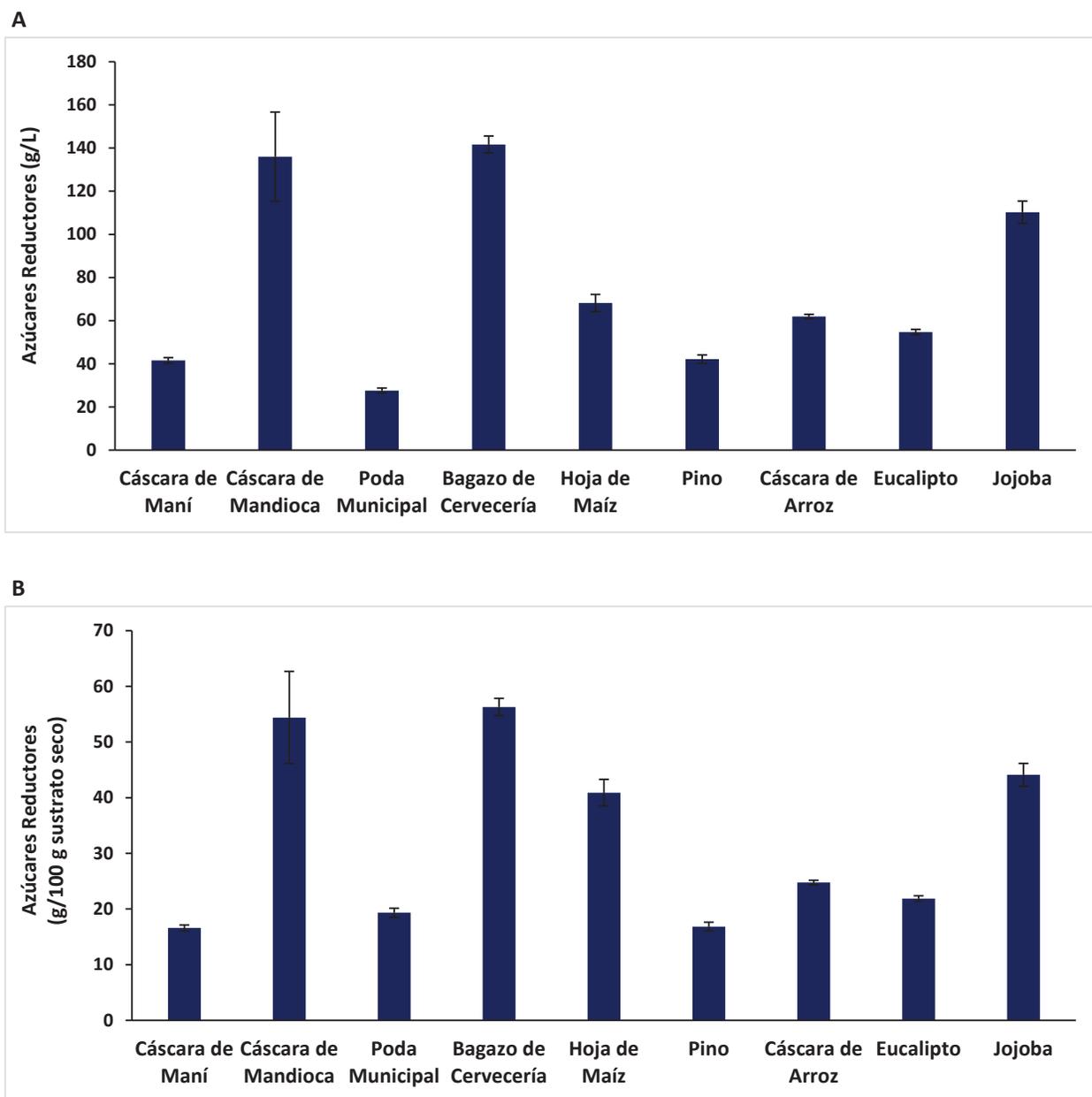
**Figura 18. Ensayo de linealidad aplicado a los métodos analíticos de cuantificación.** Curvas de calibración correspondientes a los distintos métodos de cuantificación utilizados: **A:** Método de cuantificación de glucosa, **B:** Método de cuantificación de azúcares reductores, **C:** Método de cuantificación de pentosas y furfurales, **D:** Método de cuantificación de fenoles. Para cada curva de calibración se indica la ecuación de la recta y el coeficiente  $R^2$ , y además el valor de absorbancia correspondiente a la respectiva solución testigo (punto rojo).

Los valores del coeficiente de correlación  $R^2$  obtenidos para las regresiones lineales en los rangos de concentración analizados, fueron considerablemente elevados para todos los métodos de cuantificación evaluados, debido a que todos los valores de  $R^2$  fueron superiores a 0,99. Cabe destacar que, las curvas de calibración fueron efectuadas cada vez que se realizaron los distintos métodos de cuantificación mencionados, obteniendo similares ecuaciones de la recta en cada repetición para cada método, y presentando elevados valores de  $R^2$  en todos los casos. Esto indica que los métodos de cuantificación colorimétricos implementados presentan un adecuado ajuste lineal en los rangos de trabajo evaluados. Asimismo, a partir del análisis de las soluciones testigo para cada método de cuantificación evaluado y utilizando las respectivas ecuaciones de la recta obtenidas, se calculó a partir de los valores de absorbancia determinados la concentración de cada solución testigo, obteniendo valores similares a las concentraciones preparadas. Estos resultados indican que los métodos analíticos evaluados son confiables para realizar la determinación de las concentraciones de glucosa, azúcares reductores, pentosas y furfurales, y fenoles, correspondientes a los hidrolizados químicos obtenidos a partir de distintos sustratos lignocelulósicos.

#### **4.2. Composición de los hidrolizados químicos lignocelulósicos**

A partir de los hidrolizados lignocelulósicos obtenidos mediante hidrólisis química de los 9 sustratos lignocelulósicos evaluados, se realizó la cuantificación de azúcares reductores, glucosa, pentosas y furfurales, y fenoles. Así, se determinó que los sustratos lignocelulósicos que aportan mayor concentración de azúcares reductores son la cáscara de mandioca y el bagazo de cervecería, seguidos por el residuo de jojoba. Los dos primeros presentaron una concentración de azúcares reductores cercana a 140 g/L de hidrolizado y 55 g/100 g de sustrato seco, mientras que el residuo de jojoba presentó un valor de 110 g/L de hidrolizado y 44 g/100 g de sustrato seco (**Figura 19**). Cabe destacar que, la hoja de maíz presentó una elevada concentración de azúcares reductores expresada en función del peso del sustrato seco, similar al residuo de jojoba, sin embargo, la concentración en el hidrolizado fue notoriamente menor al de la jojoba. Esto se debe a que se utilizaron distintas proporciones sólido/líquido para dichos sustratos lignocelulósicos en el proceso de hidrólisis química. Así, para el residuo de jojoba se empleó una relación sólido/líquido de 1:4, mientras que para la hoja de maíz la relación sólido/líquido fue 1:6. Esta diferencia condujo a que, para obtener el mismo volumen final de hidrolizado de ambos sustratos, se necesitara una menor cantidad de hojas de maíz en comparación con el residuo de jojoba. En consecuencia, los componentes del hidrolizado ya sean nutrientes o inhibidores, provienen de una cantidad menor de sustrato seco en el caso de la hoja de maíz. Por lo tanto, al normalizar estos valores a 100 g de sustrato seco, se observa un aumento en los niveles de concentración para la hoja de maíz en comparación con el residuo de jojoba. Por último, se puede observar que los

valores de concentración de azúcares reductores para el resto de los sustratos lignocelulósicos no superaron los 65 g/L de hidrolizado y 25 g/100 g de sustrato seco (**Figura 19**).

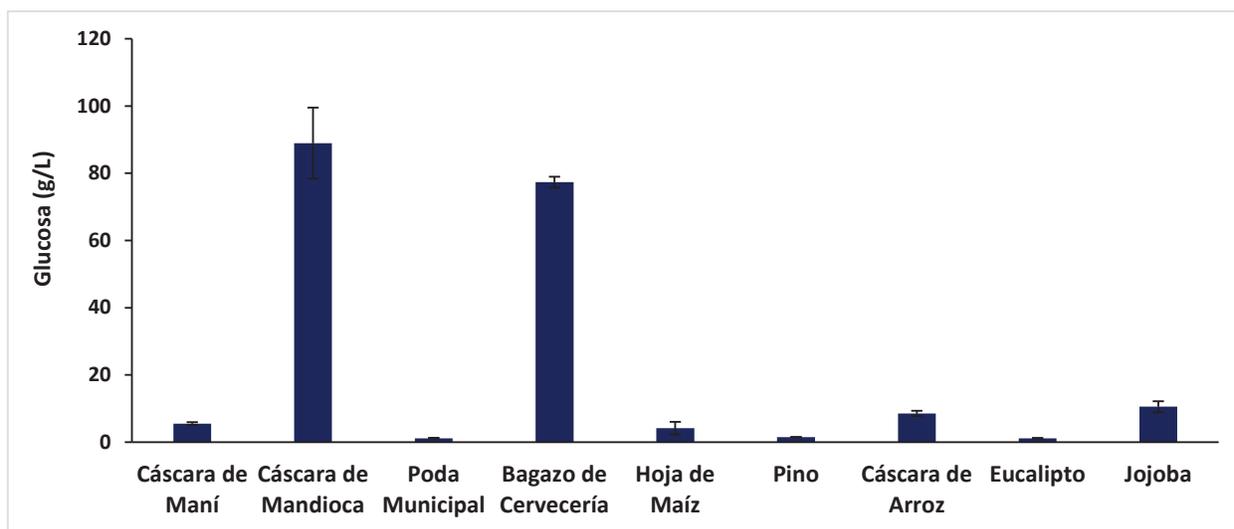


**Figura 19. Concentración de azúcares reductores en los hidrolizados obtenidos mediante hidrólisis química de los distintos sustratos lignocelulósicos evaluados: A: concentración de azúcares reductores expresada en g/L de hidrolizado, B: concentración de azúcares reductores expresada en gramos cada 100 gramos de sustrato seco.**

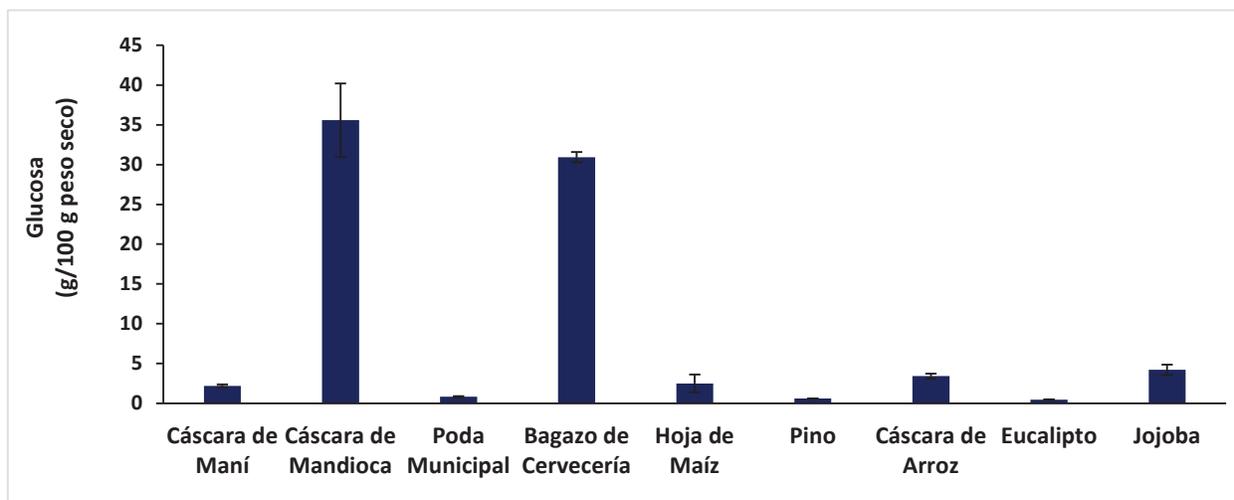
Asimismo, se logró determinar que los sustratos lignocelulósicos que aportan mayor concentración de glucosa son la cáscara de mandioca y el bagazo de cervecería, con una concentración cercana a 90 y 80 g/L de hidrolizado, respectivamente, y próxima a 35 y 30 g/100 g de sustrato seco, respectivamente. Asimismo, se determinó que el resto de los sustratos lignocelulósicos evaluados no superaron una concentración de glucosa de 11 g/L de hidrolizado y 5 g/100 g de sustrato seco (**Figura 20**).

Con respecto a la cuantificación de pentosas de los hidrolizados lignocelulósicos (**Figura 21**), se pudo determinar que el bagazo de cervecería y la hoja de maíz son los sustratos que mayor concentración de pentosas aportan con valores cercanos a 30 g/L de hidrolizado para ambos sustratos, y 13 y 18 g/100 g de sustrato seco, respectivamente. A estos sustratos le siguen la cáscara de arroz y el residuo de jojoba, con valores próximos a 25 y 20 g/L de hidrolizado, respectivamente, y valores cercanos a 10 y 8 g/100 g de sustrato seco, respectivamente. Finalmente, el resto de los sustratos no superaron una concentración de 17 g/L en sus hidrolizados y de 7 g/100 g en sustrato seco; siendo la cáscara de mandioca el sustrato de menor concentración de pentosas en el hidrolizado con un valor cercano 6 g/L y también el menor en base seca con una concentración de pentosas próxima a 2 g/100 g.

A

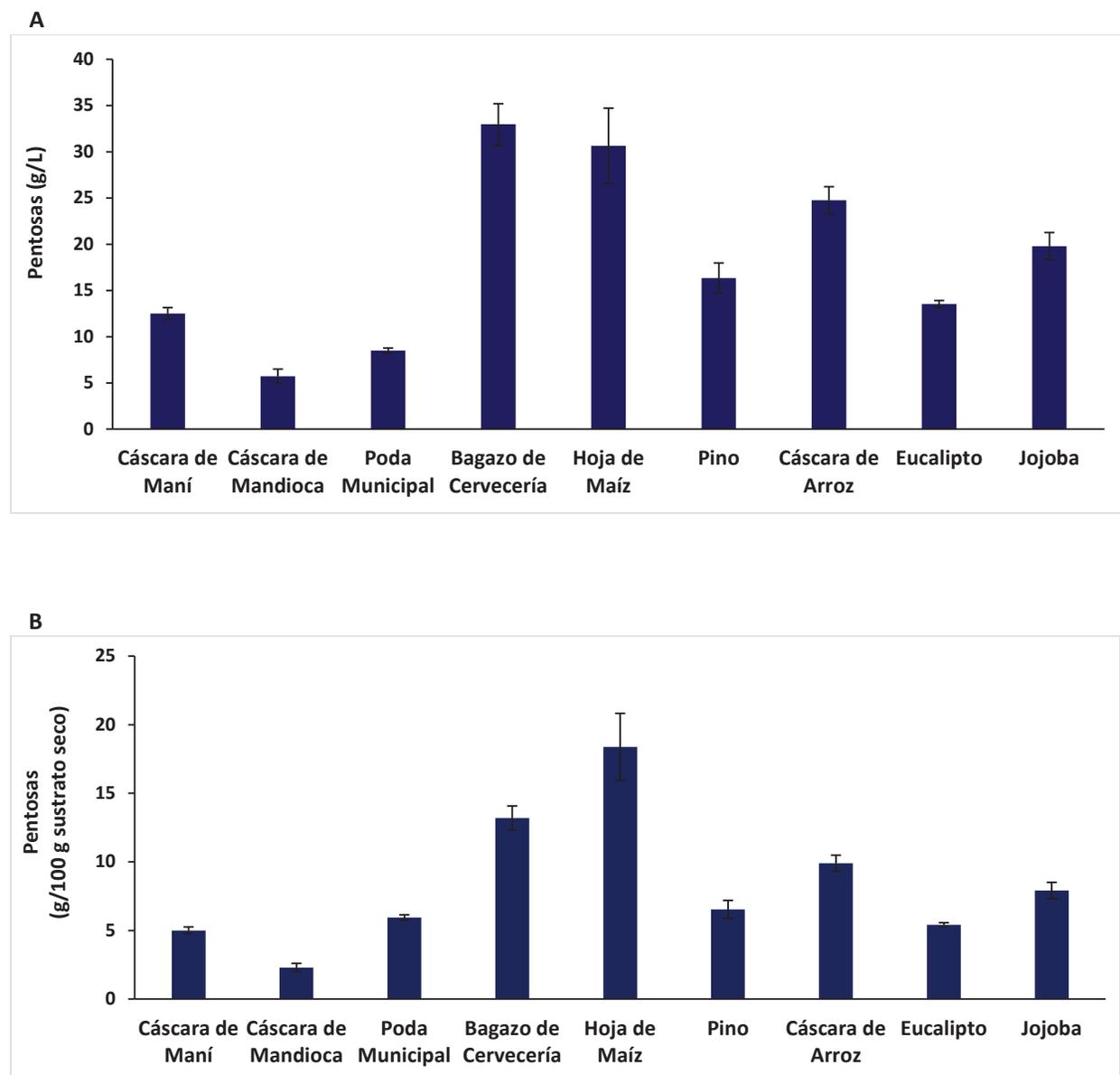


B



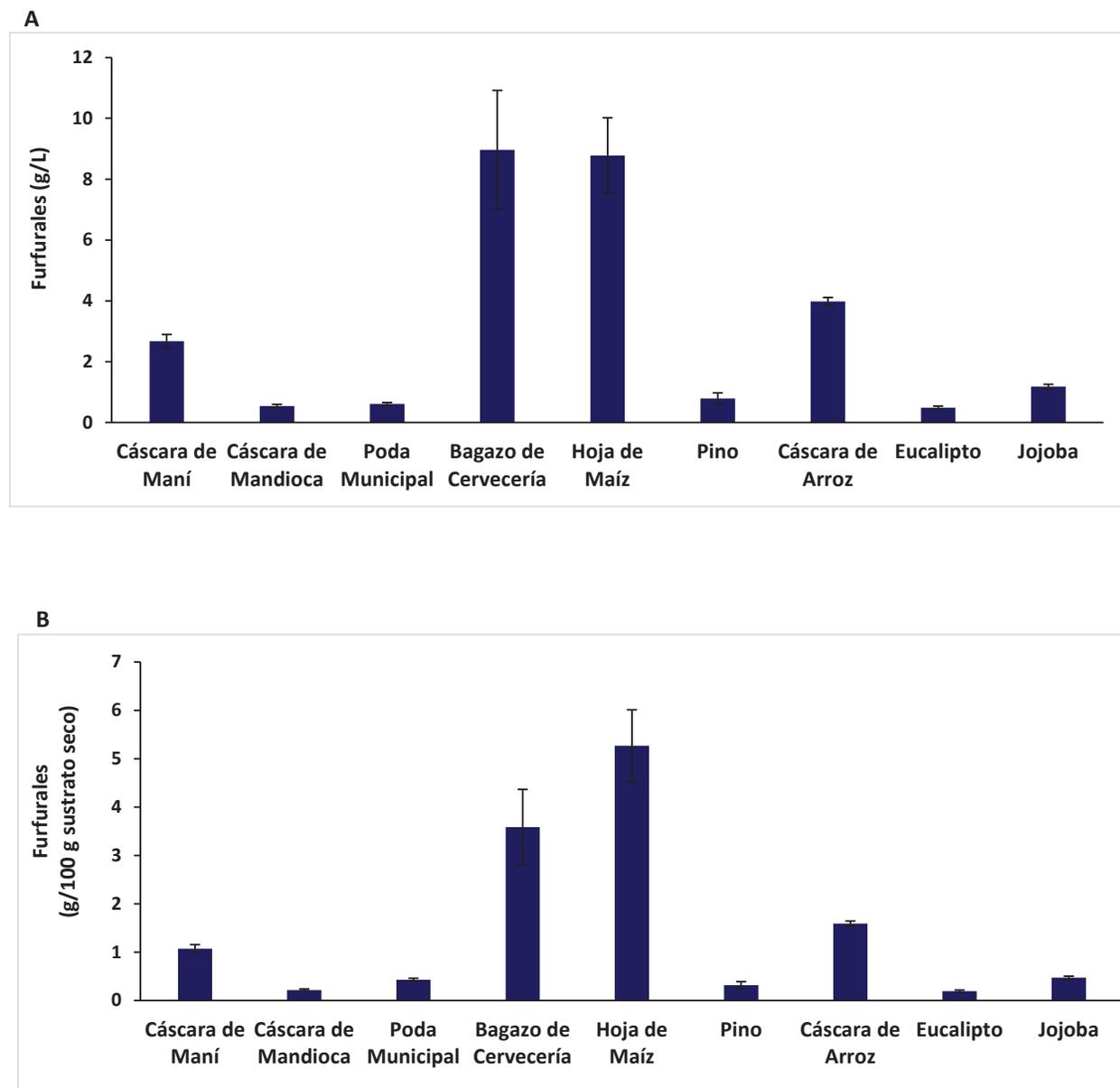
**Figura 20. Concentración de glucosa en los hidrolizados obtenidos mediante hidrólisis química de los distintos sustratos lignocelulósicos evaluados: A: concentración de glucosa expresada en g/L de hidrolizado, B: concentración de glucosa expresada en gramos cada 100 gramos de sustrato seco.**

Por otro lado, se determinó que los sustratos que generan mayor cantidad de furfurales son el bagazo de cervecería y la hoja de maíz con valores de concentración cercanos a 9 g/L en sus hidrolizados y valores próximos a 4 y 5 g/100 g de sustrato seco, respectivamente. El resto de los sustratos presentaron concentraciones de furfurales menores a 4 g/L en sus hidrolizados y 2 g/100 g de sustrato seco (**Figura 22**).

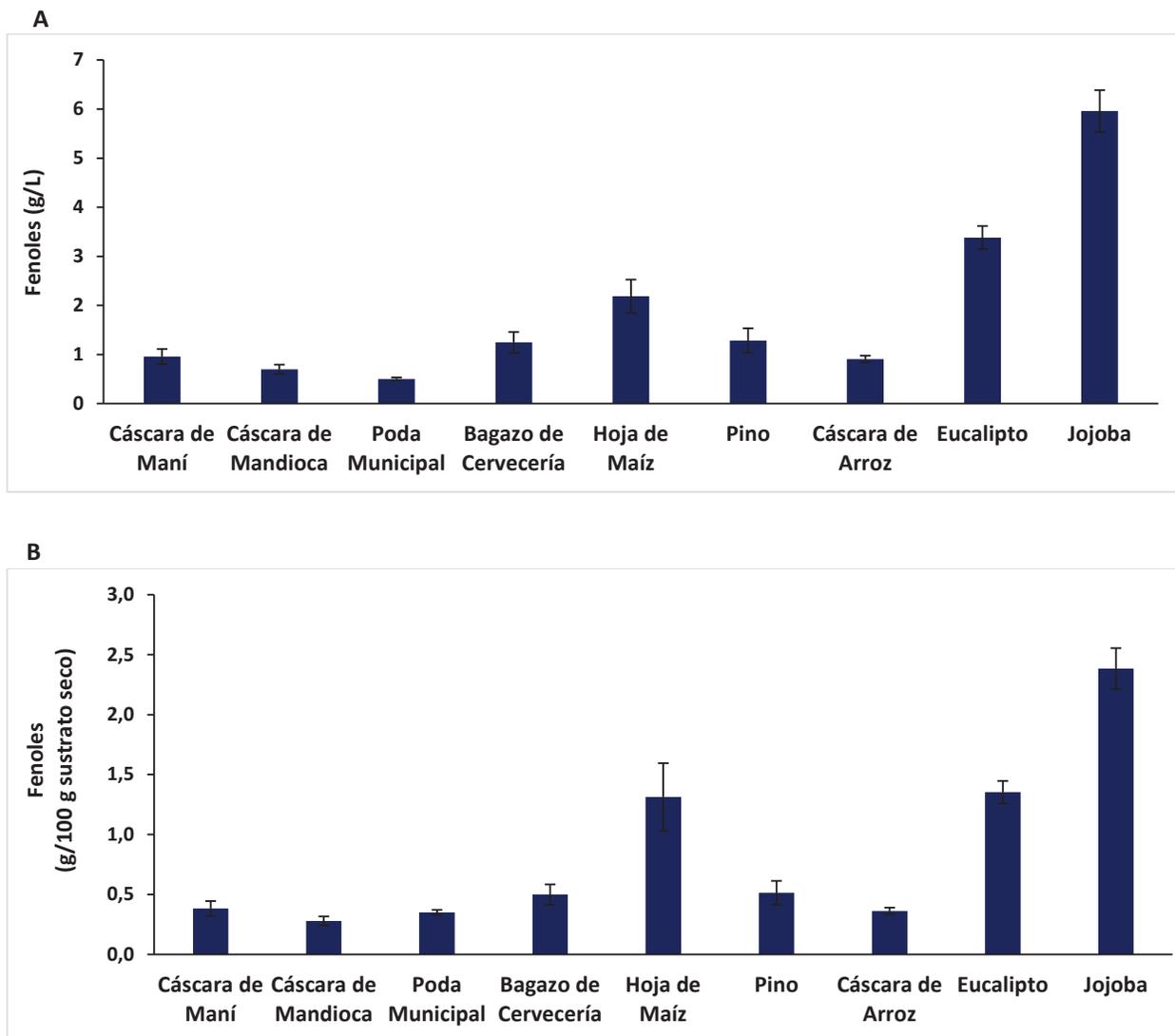


**Figura 21. Concentración de pentosas de los hidrolizados obtenidos mediante hidrólisis química de los distintos sustratos lignocelulósicos evaluados: A: concentración de pentosas expresada en g/L, B: concentración de pentosas expresada en gramos cada 100 gramos de sustrato seco.**

Por último, se determinó que el residuo de jojoba es el sustrato que aporta mayor concentración de fenoles, con un valor de 6 g/L en su hidrolizado y 2,4 g/100 g de sustrato seco. El resto de los sustratos lignocelulósicos analizados presentaron concentraciones de fenoles menores a 3,5 g/L en sus hidrolizados y a 1,5 g/100 g de sustrato seco (**Figura 23**).



**Figura 22. Concentración de furfurales en los hidrolizados obtenidos mediante hidrólisis química de los distintos sustratos lignocelulósicos evaluados: A: concentración de furfurales expresada en g/L de hidrolizado, B: concentración de furfurales expresada en gramos cada 100 gramos de sustrato seco.**



**Figura 23. Concentración de fenoles en los hidrolizados obtenidos mediante hidrólisis química de los distintos sustratos lignocelulósicos evaluados: A: concentración de fenoles expresada en g/L de hidrolizado, B: concentración de fenoles expresada en gramos cada 100 gramos de sustrato seco.**

#### **4.3. Análisis de aptitud de los sustratos lignocelulósicos mediante sistema de puntajes**

En la **Tabla 6** se indican los resultados obtenidos a partir del análisis de aptitud realizado con los distintos sustratos lignocelulósicos evaluados, en pos de seleccionar el sustrato lignocelulósico más adecuado para la obtención de hidrolizados lignocelulósicos ricos en azúcares, para su utilización en la producción de biohidrógeno mediante fermentación. La cáscara de arroz fue el sustrato que mayor puntaje alcanzó a partir del Análisis de Aptitud entre todos los sustratos lignocelulósicos evaluados, alcanzando un valor de 0,06 puntos. Esta determinación se consiguió a partir de la implementación del sistema de puntajes con el cual se evaluó para cada sustrato su disponibilidad, facilidad de almacenamiento y transporte, y concentración de nutrientes e inhibidores microbianos presentes en sus correspondientes hidrolizados. Así, el sustrato cáscara de arroz se destaca por presentar en su hidrolizado concentraciones de glucosa

(8,5 ± 0,8 g/L) y pentosas (25 ± 1 g/L) óptimas para favorecer la producción de hidrógeno por medio del metabolismo acidogénico del proceso de fermentación oscura. Asimismo, el hidrolizado de cáscara de arroz no presentó concentraciones de furfurales y fenoles sumamente elevadas, en comparación con otros hidrolizados evaluados, lo cual también se presenta como una ventaja. Además, se destaca por poseer un reducido costo de almacenamiento y transporte. Con respecto a su disponibilidad, la cáscara de arroz presenta poca abundancia en relación con otros sustratos como la hoja de maíz y el residuo de poda de pino, pero posee la ventaja de no presentar otra posible aplicación que pudiera competir con su implementación en un sistema productivo de biohidrógeno. Por tales motivos, se puede establecer que la cáscara de arroz es el sustrato más adecuado, entre los evaluados, para la obtención de hidrolizados ricos en azúcares para su utilización en la producción de biohidrógeno mediante fermentación anaeróbica de un consorcio microbiano. Por otro lado, por medio de los cálculos realizados se pudo determinar que los porcentajes de conversión de celulosa y hemicelulosa a glucosa y pentosas respectivamente, para la hidrólisis ácida de la cáscara de arroz fueron 5 % y 20 %, respectivamente. Asimismo, según el análisis de aptitud, otros sustratos que se presentaron como adecuados para su utilización en la producción de biohidrógeno, luego de la cáscara de arroz, fueron la cáscara de maní (0,03 puntos) y a continuación el residuo de jojoba (0 puntos). Por otro lado, el sustrato que se posicionó como el menos adecuado para dicho fin fue la hoja de maíz que, a pesar de exhibir elevada abundancia, presentó puntaje negativo en la mayoría del resto de los criterios, lo cual generó que la sumatoria fuera la menor entre los sustratos lignocelulósicos evaluados (-3,5 puntos).

	Nutrientes	Inhibidores		Disponibilidad		Almacenamiento	Transporte	Sumatoria
		Furfurales	Fenoles	Desvío de la aplicación habitual	Abundancia			
Cáscara de Maní	0	-0,5	-0,5	0	0,03	0	1	<b>0,03</b>
Cáscara de Mandioca	-1	0	0	-0,5	0,00	0	1	<b>-0,50</b>
Poda Municipal	0	0	0	0	0,10	0	-1	<b>-0,90</b>
Bagazo de Cervecería	-1	0	0	0	0,12	-1	1	<b>-0,88</b>
Hoja de Maíz	-1	-1	-1	-0,5	1,00	0	-1	<b>-3,50</b>
Residuo de Pino	0	0	-0,5	0	0,18	0	-1	<b>-1,32</b>
Cáscara de Arroz	0	-0,5	-0,5	0	0,06	0	1	<b>0,06</b>
Residuo de Eucalipto	0	0	-1	0	0,10	0	-1	<b>-1,90</b>
Residuo de Jojoba	0	0	-1	0	0,00	0	1	<b>0,00</b>

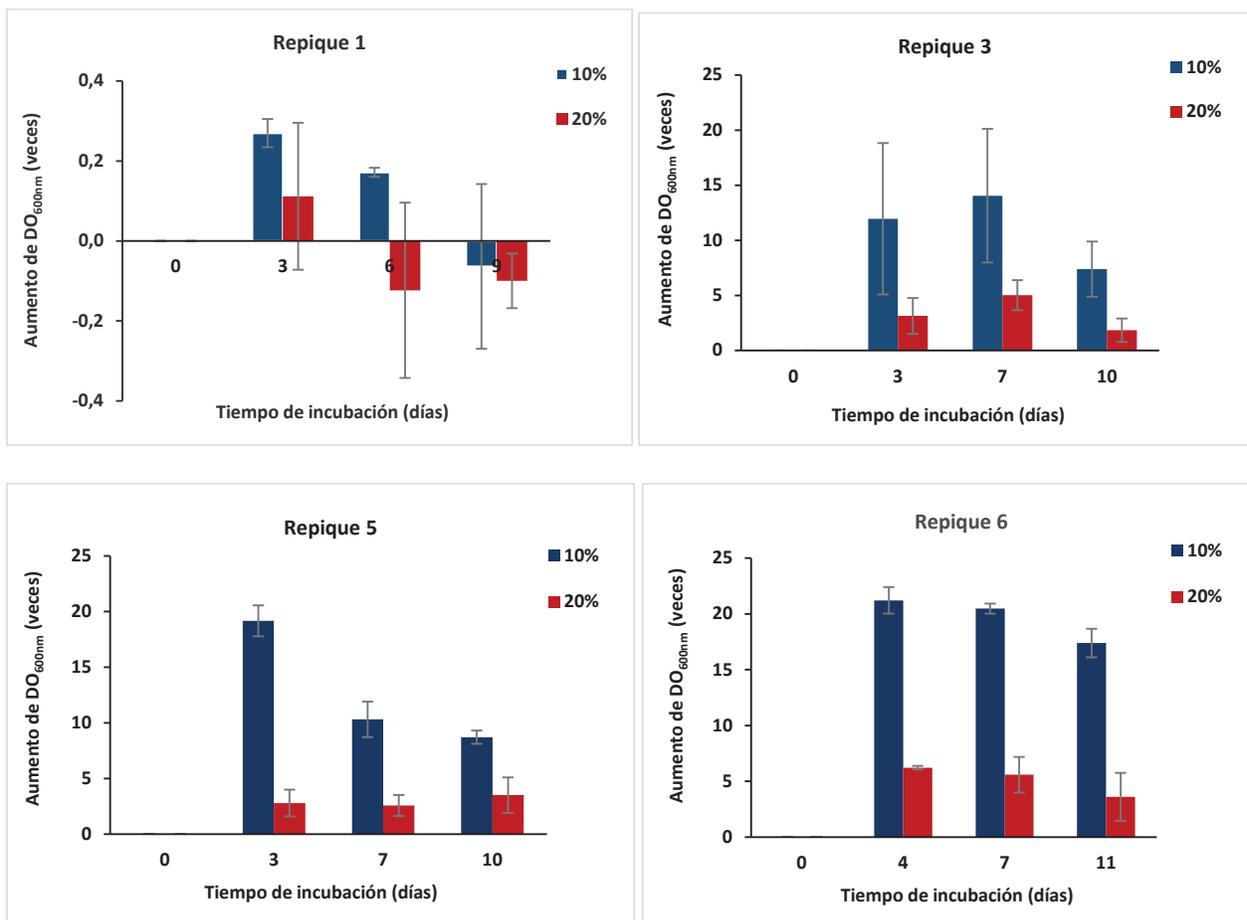
**Tabla 6. Análisis de aptitud de los sustratos lignocelulósicos mediante sistema de puntaje.** Los criterios evaluados para cada sustrato fueron: concentración de nutrientes e inhibidores microbianos en los hidrolizados lignocelulósicos, disponibilidad, almacenamiento y transporte de los sustratos lignocelulósicos.

#### 4.4. Adaptación del consorcio microbiano al medio definido de Logan mediante pasajes sucesivos

Con el objetivo de conseguir la adaptación del consorcio microbiano a un medio de cultivo definido y eliminar la materia orgánica e impurezas presentes en el líquido proveniente del biodigestor, se

realizaron pasajes o repiques sucesivos en medio definido de Logan. De esta manera, en la **Figura 24** se muestra el aumento del nivel de biomasa del consorcio bacteriano ( $DO_{600nm}$ ) durante la incubación con respecto al inicio del cultivo, para los repiques que se efectuaron al 10 % y 20 % (v/v).

Así, cabe destacar que para el Repique 1 la medición de la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ), fue muy variable a lo largo de la incubación, arrojando a tiempos avanzados valores de  $DO_{600nm}$  inferiores a los obtenidos al inicio de la incubación, y por ende generando valores negativos de aumento de biomasa microbiana. Esto se debe principalmente a que el inóculo del consorcio microbiano proviene de un biodigestor con elevado contenido de materia orgánica, la cual interfiere con la correcta medición de la absorbancia a 600 nm mediante espectrofotometría. Cabe destacar que, a medida que aumentó el número de repiques, la materia orgánica inicial se diluyó y la absorbancia medida se pudo correlacionar con la cantidad de biomasa en los cultivos, por este motivo no se observaron valores negativos de aumento de biomasa para los Repiques 3, 5 y 6.



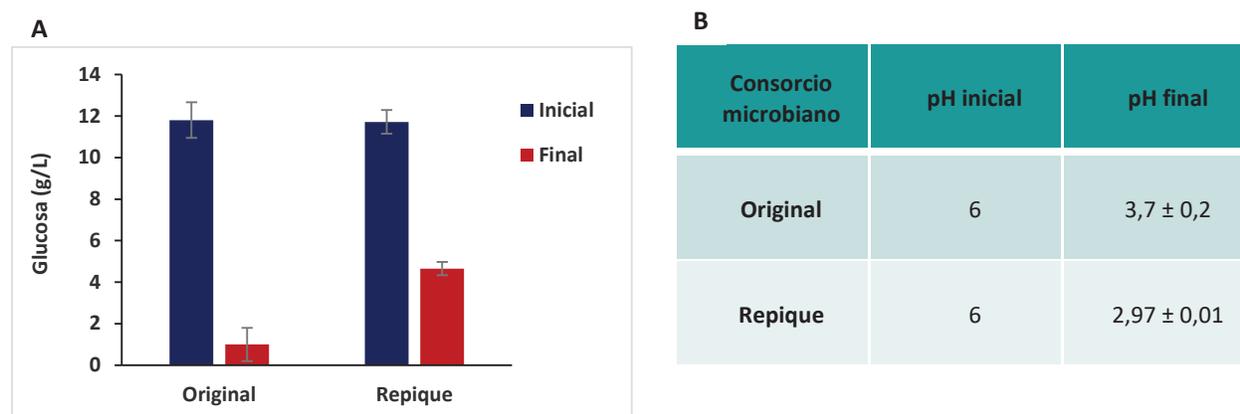
**Figura 24. Aumento de la biomasa del consorcio bacteriano ( $DO_{600nm}$ ) durante la incubación con respecto al inicio de los cultivos.** El aumento de  $DO_{600nm}$  en función del tiempo de incubación (días) se expresa en veces respecto al inicio de los cultivos en el medio definido de Logan, para una selección representativa de repiques realizados al 10 % y 20 % (v/v).

Otro aspecto importante para mencionar es que la  $DO_{600nm}$  presentó mayor aumento con respecto al tiempo inicial en los cultivos para los cuales los repiques se realizaron al 10 % en comparación con los repicados al 20 %. Esto podría deberse a que los cultivos repicados al 10 % comienzan con menor biomasa y llegan a un nivel de biomasa similar al de los cultivos repicados al 20 %, por lo que el aumento de biomasa es mayor para los cultivos repicados al 10 %. Asimismo, en la **Figura 24** se puede observar que en los Repiques 3, 6, y más notoriamente en el Repique 5, el aumento de la  $DO_{600nm}$  comenzó a disminuir luego de alcanzar un valor máximo. Esto se puede deber a que al agotarse los nutrientes del medio de cultivo, los microorganismos del consorcio experimentan un proceso de lisis o ruptura celular, por lo cual se genera una disminución de la  $DO_{600nm}$  y por ende del aumento del nivel de biomasa.

#### 4.5. Producción de hidrógeno mediante fermentación anaeróbica en medio definido de Logan

El crecimiento del consorcio microbiano original y del consorcio proveniente de repiques sucesivos fue evaluado mediante el consumo de glucosa y por medio de la disminución del pH de cultivos realizados en frascos *Erlenmeyer* con medio definido de Logan. Asimismo, se evaluó la concomitante producción de gas a partir de dichos cultivos fermentativos y el porcentaje de hidrógeno presente en dicho gas.

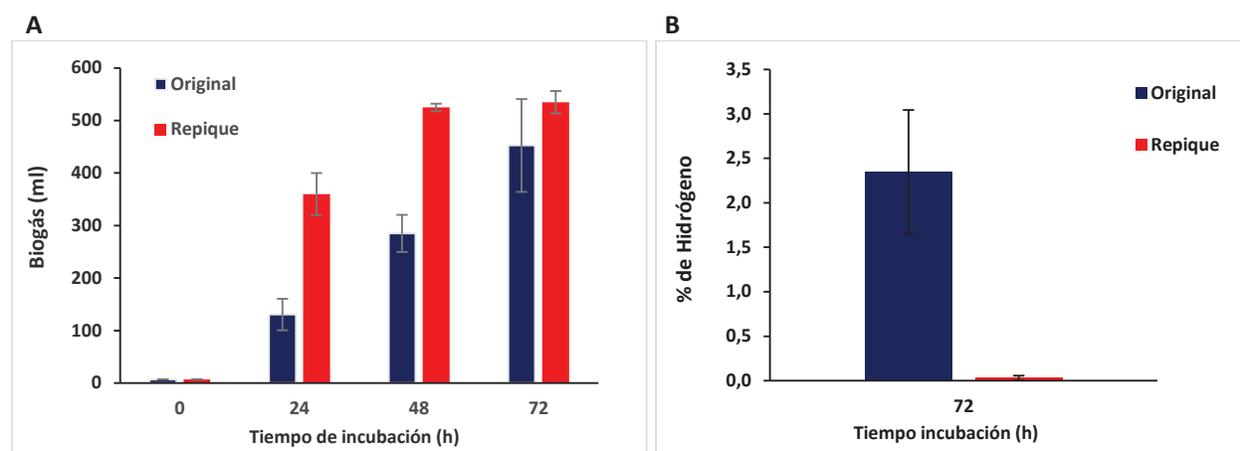
Así, en la **Figura 25 A** se puede observar que el consumo de glucosa al finalizar la incubación fue mayor para los cultivos inoculados con el consorcio microbiano original, obteniéndose un consumo de aproximadamente 11 g/L de glucosa, comparando con los cultivos inoculados con el consorcio microbiano proveniente de los repiques, para los cuales el consumo de glucosa fue cercano a 7 g/L. Con respecto al pH, se determinó que todos los cultivos se acidificaron, en particular los cultivos realizados con el consorcio microbiano original alcanzaron un pH final de 3,7; mientras que los cultivos inoculados con el consorcio proveniente de los repiques presentaron un pH final cercano a 3 (**Figura 25 B**).



**Figura 25. Consumo de glucosa y variación de pH en cultivos realizados en frascos *Erlenmeyer* con medio definido de Logan. A:** Concentraciones de glucosa al inicio y al final de los cultivos inoculados con el consorcio microbiano original (indicado como: Original) y con el consorcio microbiano proveniente de repiques (indicado como: Repique). **B:** Variación del pH de los cultivos inoculados con el consorcio microbiano original (indicado como: Original) y con el consorcio microbiano proveniente de repiques (indicado como: Repique).

Cabe remarcar que, si bien no se evaluó el aumento de biomasa debido a las interferencias en las mediciones de absorbancia previamente mencionadas, el crecimiento del consorcio microbiano en ambos tipos de cultivo quedó claramente evidenciado mediante el consumo de glucosa y la acidificación de los cultivos.

Asimismo, se evaluó la producción de gas y en particular de hidrógeno a partir de los cultivos realizados en frascos *Erlenmeyer* con medio definido de Logan. Así, en la **Figura 26** se muestran los resultados correspondientes al volumen de biogás producido (ml) y al porcentaje de biohidrógeno en el gas para los cultivos realizados con el consorcio microbiano original y con el consorcio proveniente de los repiques sucesivos. Hasta las 48 h de incubación, se observó que los cultivos inoculados con el consorcio proveniente de los repiques produjeron mayor cantidad de gas que los cultivos inoculados con el consorcio original. Sin embargo, a las 72 h de incubación se observó que la producción de gas alcanzó niveles similares para ambos tipos de cultivos (**Figura 26 A**). Además, se determinó que a partir de los cultivos inoculados con el consorcio original se logró obtener 2,35 % de hidrógeno en el biogás generado, mientras que a partir de los cultivos inoculados con el consorcio proveniente de los repiques no se detectó hidrógeno en el gas producido (**Figura 26 B**). Esto indicaría que el consorcio microbiano proveniente de los repiques habría perdido la capacidad de producir hidrógeno mediante fermentación anaeróbica, por lo que en los siguientes ensayos se utilizó el consorcio microbiano original como inóculo. Cabe mencionar que, a partir de los cultivos inoculados con el consorcio original se obtuvieron 10 ml de hidrógeno, luego de 72 h de incubación bajo condiciones anaeróbicas. Asimismo, a dicho tiempo de incubación se alcanzaron los siguientes parámetros: concentración de hidrógeno generado: 3,5 mg H<sub>2</sub>/L cultivo, productividad volumétrica (P<sub>V</sub>) de hidrógeno: 0,05 mg H<sub>2</sub>/Lh, productividad total (P<sub>T</sub>) de hidrógeno: 0,01 mg H<sub>2</sub>/h y rendimiento de hidrógeno (Y<sub>H<sub>2</sub>/Gluc</sub>): 0,08 mg H<sub>2</sub>/g glucosa.

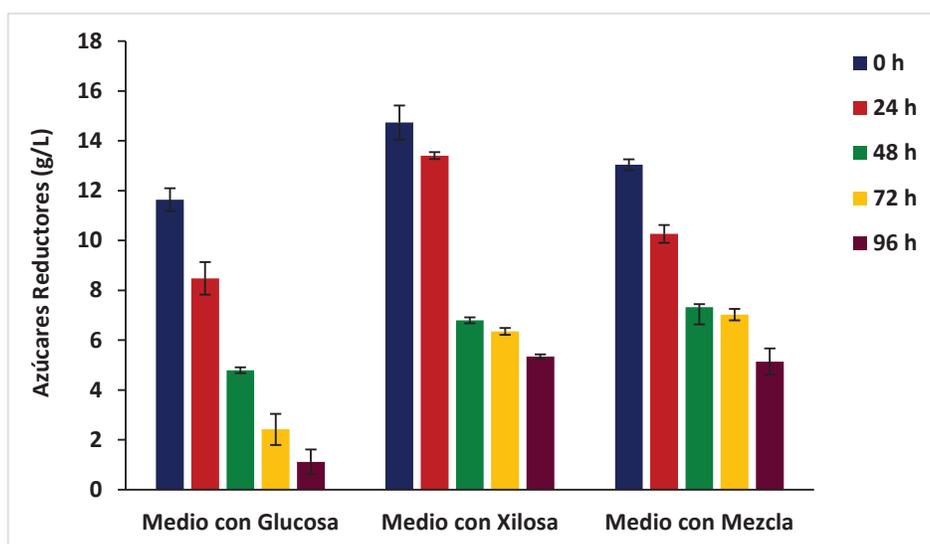


**Figura 26. Biogás producido y porcentaje de hidrógeno en el gas. A:** Volumen de gas (ml) producido a partir de los cultivos en medio definido de Logan inoculados con el consorcio microbiano original (barras azules) y con el consorcio proveniente de repiques (barras rojas). **B:** Porcentaje de hidrógeno presente en el gas generado a partir de los cultivos realizados con el consorcio microbiano original (barra azul) y con el consorcio proveniente de repiques (barra roja).

#### 4.6. Crecimiento del consorcio bacteriano en medio definido de Logan con distintas fuentes de carbono

El crecimiento del consorcio microbiano se analizó mediante cultivos en medio definido de Logan utilizando como fuente de carbono: glucosa, xilosa y una mezcla equitativa de ambas fuentes de carbono. Como indicador del crecimiento de los cultivos, se evaluó el consumo de azúcares reductores, glucosa, pentosas y la variación del pH. Se debe tener en cuenta que la metodología de cuantificación de azúcares reductores sobreestima la cantidad de xilosa debido a que el reactivo ácido dinitrosalicílico (DNS) reacciona con el extremo reductor de los azúcares, y la xilosa presenta una mayor cantidad de extremos reductores por gramo en comparación con la glucosa. Asimismo, cabe aclarar que la medición que resulta más acertada es la cuantificación de glucosa debido a que su correspondiente curva de calibración de absorbancia versus concentración (g/L) se efectuó utilizando dicho azúcar.

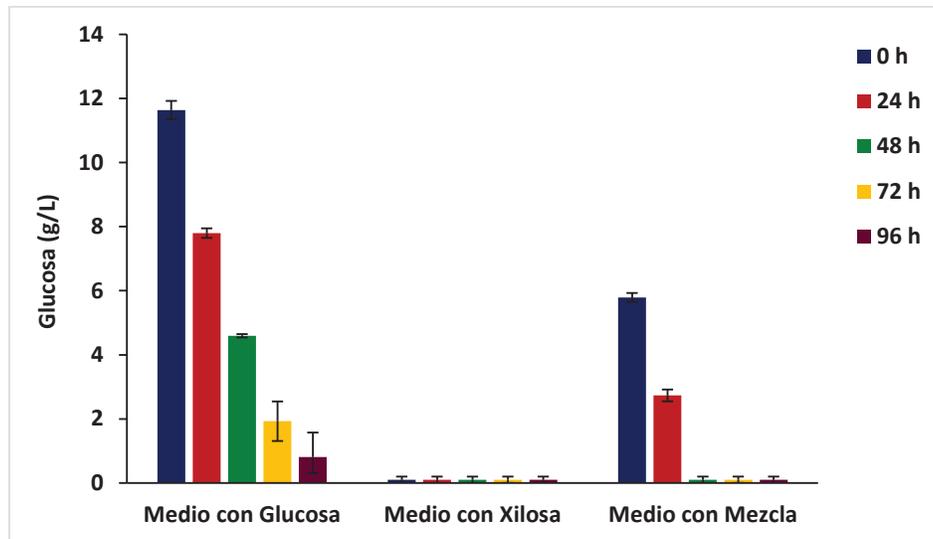
Así, en la **Figura 27** se muestra el consumo de azúcares reductores en todos los cultivos realizados en medio definido con las distintas fuentes de carbono. A través de esta Figura se puede observar que se registró consumo de azúcares reductores en todos los cultivos del consorcio en medio definido ya sea con glucosa, xilosa y la mezcla equitativa de ambas fuentes de carbono.



**Figura 27. Consumo de azúcares reductores en los cultivos con medio definido.** Consumo de azúcares reductores durante el crecimiento del consorcio bacteriano en medio definido de Logan utilizando como fuente de carbono: glucosa (15 g/L), xilosa (15 g/L) y una mezcla de ambos azúcares (7,5 g/L cada uno).

Asimismo, en la **Figura 28** se muestra el consumo de glucosa en los cultivos del consorcio microbiano en medio definido. Así, se puede observar que este azúcar se consumió solamente, en los cultivos donde fue añadida esta fuente de carbono (medio con glucosa y medio con mezcla de glucosa y xilosa), lo cual indica que el inóculo no aportó cantidades significativas de glucosa. En los cultivos con glucosa como única fuente de carbono la velocidad volumétrica de consumo de glucosa fue 0,11 g/L h,

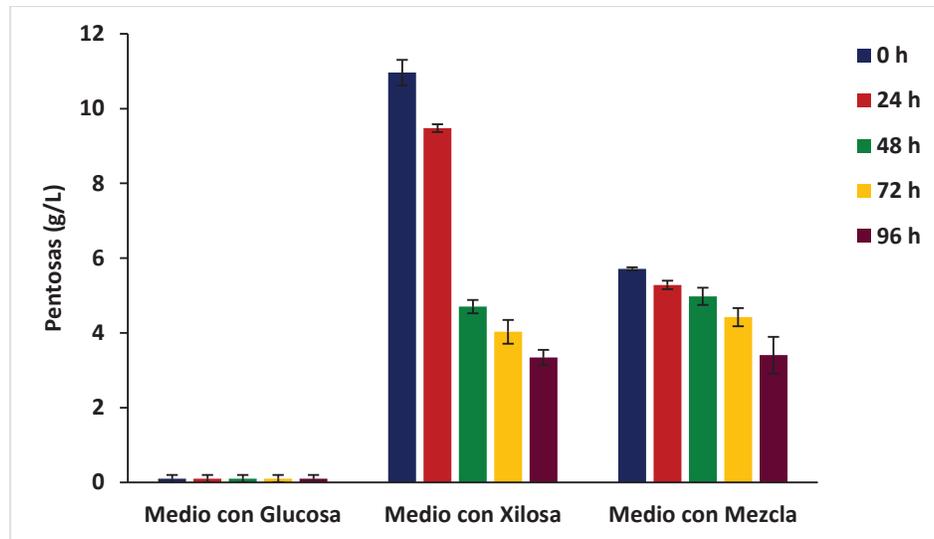
alcanzando un consumo total de glucosa de 10,8 g/L a las 96 h de incubación, con una concentración remanente de 0,8 g/L. En los cultivos realizados en medio definido con la mezcla de glucosa y xilosa como fuentes de carbono, se determinó una velocidad volumétrica de consumo de glucosa de 0,12 g/L h, alcanzando el consumo total de este azúcar (5,8 g/L) a las 48 h de incubación.



**Figura 28. Consumo de glucosa en los cultivos con medio definido.** Consumo de glucosa durante el crecimiento del consorcio bacteriano en medio definido de Logan utilizando como fuente de carbono: glucosa (15 g/L), xilosa (15 g/L) y una mezcla de ambos azúcares (7,5 g/L cada uno).

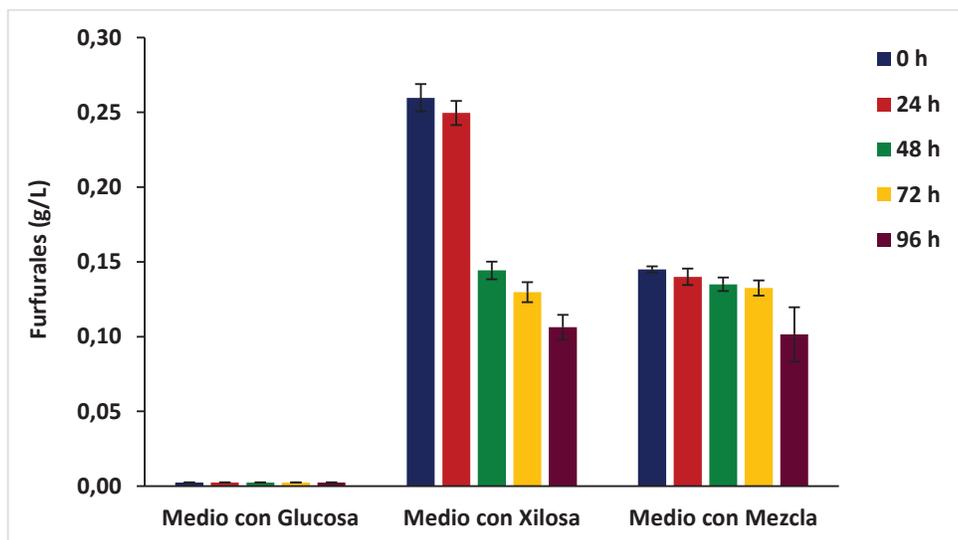
En la **Figura 29** se muestran los resultados del consumo de pentosas de los distintos cultivos del consorcio microbiano, evidenciando que el consorcio microbiano no aportó cantidades significativas de pentosas, debido a que esta fuente de carbono se logró cuantificar únicamente en los cultivos en los que se añadió xilosa (medio con xilosa y medio con mezcla). El consumo de pentosas para los cultivos con xilosa como única fuente de carbono fue aproximadamente 7,6 g/L, con una concentración remanente de 3,3 g/L y para los cultivos con la mezcla de glucosa y xilosa el consumo de pentosas fue 2,3 g/L, con una concentración remanente de 3,4 g/L. Por otra parte, para los cultivos con xilosa como única fuente de carbono, el mayor consumo de este sustrato se registró entre las 24 y 48 h, con un valor de 4,8 g/L de xilosa consumida, que corresponde aproximadamente a un 50 % de disminución de la concentración del sustrato. La velocidad volumétrica de consumo de pentosas para los cultivos con xilosa fue 0,9 g/L h, mientras que para los cultivos con la mezcla de glucosa y xilosa fue 0,02 g/L h. Asimismo, resulta interesante destacar que en los cultivos con la mezcla de glucosa y xilosa se determinó que el consumo de pentosas se aceleró a partir de las 72 h de incubación, es decir luego de que la glucosa se haya consumido completamente. Cabe indicar que, en ninguno de los cultivos se registró un consumo total de xilosa, debido a que finalizada la incubación (96 h), los cultivos con xilosa

como única fuente de carbono presentaron una concentración remanente de este sustrato de aproximadamente 3,3 g/L y los cultivos conteniendo la mezcla de ambas fuentes de carbono exhibieron una concentración remanente de xilosa de 3,4 g/L. Estos resultados indicarían que este consorcio microbiano presenta preferencia por el consumo de glucosa respecto a xilosa.



**Figura 29. Consumo de pentosas en los cultivos con medio definido.** Consumo de pentosas durante el crecimiento del consorcio bacteriano en medio definido de Logan utilizando como fuente de carbono: glucosa (15 g/L), xilosa (15 g/L) y una mezcla de ambos azúcares (7,5 g/L cada uno).

Con respecto a la cuantificación de furfurales, la **Figura 30** muestra que solo se detectaron estos compuestos en aquellos cultivos realizados en medio definido con xilosa y con la mezcla de ambas fuentes de carbono. Así, en estos cultivos se registraron pequeñas concentraciones de furfurales, entre 0,26 g/L y 0,10 g/L, desde el inicio hasta el final de la incubación. Los furfurales se generan durante el proceso de esterilización en autoclave, ya que la presión y temperatura de este procedimiento catalizan la reacción de formación de furfurales a partir de las pentosas presentes en el medio. Cabe destacar que, en los cultivos con xilosa como única fuente de carbono se registró un descenso en la concentración de furfurales de aproximadamente 0,15 g/L durante la incubación, mientras que en los cultivos con la mezcla de glucosa y xilosa este descenso fue de 0,04 g/L. Dicha disminución en la concentración de furfurales pudo haber sido debido a que estos compuestos fueron posiblemente metabolizados por el propio consorcio microbiano, ya que ciertas bacterias pueden presentar esta capacidad tal como se ha reportado (Akobi *et al.*, 2016). Además, cabe remarcar que, se pudo comprobar que el consorcio microbiano no aportó furfurales al cultivo, debido a que no se detectaron estos compuestos en aquellos cultivos realizados en medio con glucosa como fuente de carbono.



**Figura 30. Variación de la concentración de furfurales en los cultivos con medio definido.** Variación de la concentración de furfurales durante el crecimiento del consorcio bacteriano en medio definido de Logan utilizando como fuente de carbono: glucosa (15 g/L), xilosa (15 g/L) y una mezcla de ambos azúcares (7,5 g/L cada uno).

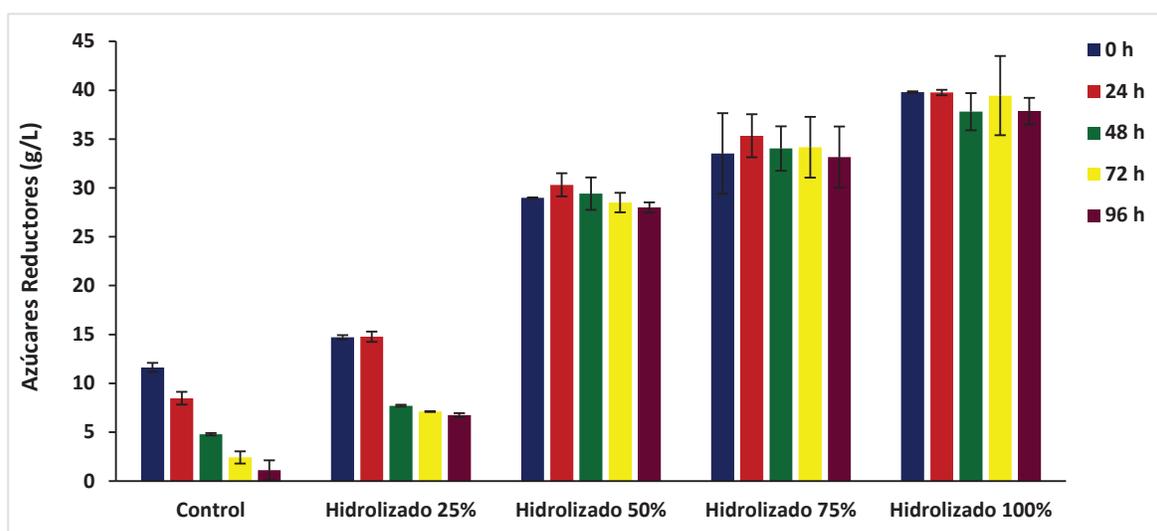
Finalmente, como se muestra en la **Tabla 7**, en todos los cultivos se determinó una disminución del pH a lo largo de la incubación, lo cual es compatible con el metabolismo de acidogénesis bacteriano del proceso de fermentación oscura. Resulta importante remarcar que, los valores de pH más ácidos se registraron en los cultivos que poseían únicamente glucosa como fuente de carbono ( $\text{pH} = 4,15 \pm 0,02$ ), seguido de los cultivos conteniendo la mezcla de azúcares ( $\text{pH} = 4,97 \pm 0,03$ ). Por otro lado, los cultivos que exhibieron un menor descenso de pH fueron aquellos con xilosa como fuente de carbono ( $\text{pH} = 5,57 \pm 0,02$ ). Este resultado estaría confirmando que el consorcio microbiano proveniente del biodigestor presenta preferencia por el consumo de glucosa respecto a xilosa, generando elevada cantidad de ácidos que son el producto final del metabolismo acidogénico.

Ensayo	pH (0 h)	pH (24 h)	pH (48 h)	pH (72 h)	pH (96 h)
Medio con Glucosa	6	5	5	4	$4,15 \pm 0,02$
Medio con Xilosa	6	6	5	5	$5,57 \pm 0,02$
Medio con Mezcla	6	5	5	5	$4,97 \pm 0,03$

**Tabla 7. Variación del pH durante el crecimiento de los cultivos en medio definido.** Variación del pH durante el crecimiento del consorcio bacteriano en medio definido de Logan utilizando como fuente de carbono: glucosa (15 g/L), xilosa (15 g/L) y una mezcla de ambos azúcares (7,5 g/L cada uno).

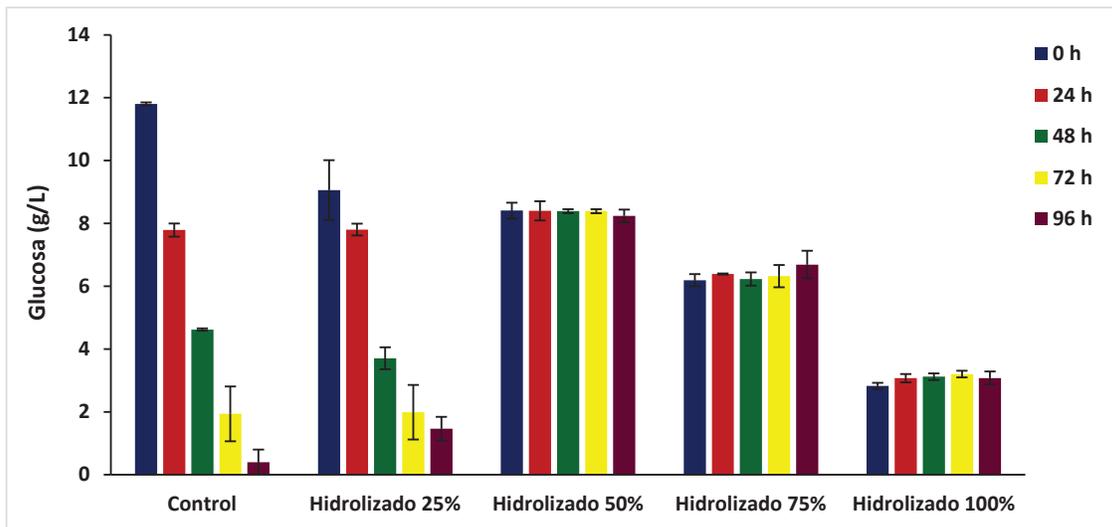
#### 4.7. Crecimiento del consorcio bacteriano en hidrolizados de cáscara de arroz

El crecimiento del consorcio bacteriano fue evaluado en frascos *Erlenmeyer* conteniendo distintas concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz sin detoxificar en medio definido de Logan. Así, en la **Figura 31** se indican las concentraciones de azúcares reductores determinadas a tiempo inicial y cada 24 h de incubación, para los cultivos del consorcio realizados en las distintas concentraciones de hidrolizado sin detoxificar en medio de Logan. Se puede observar que, los cultivos efectuados en 25 % (v/v) de hidrolizado en medio de Logan presentaron un consumo de azúcares reductores de aproximadamente 8 g/L a las 96 h de incubación. Por otra parte, a partir de los cultivos realizados en 50 %, 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado no se evidenció un consumo significativo de azúcares reductores durante la incubación. Además, como era de esperar, los cultivos control realizados en medio definido de Logan mostraron prácticamente un consumo total de los azúcares reductores cuantificados al inicio de la incubación (11,5 g/L aproximadamente).



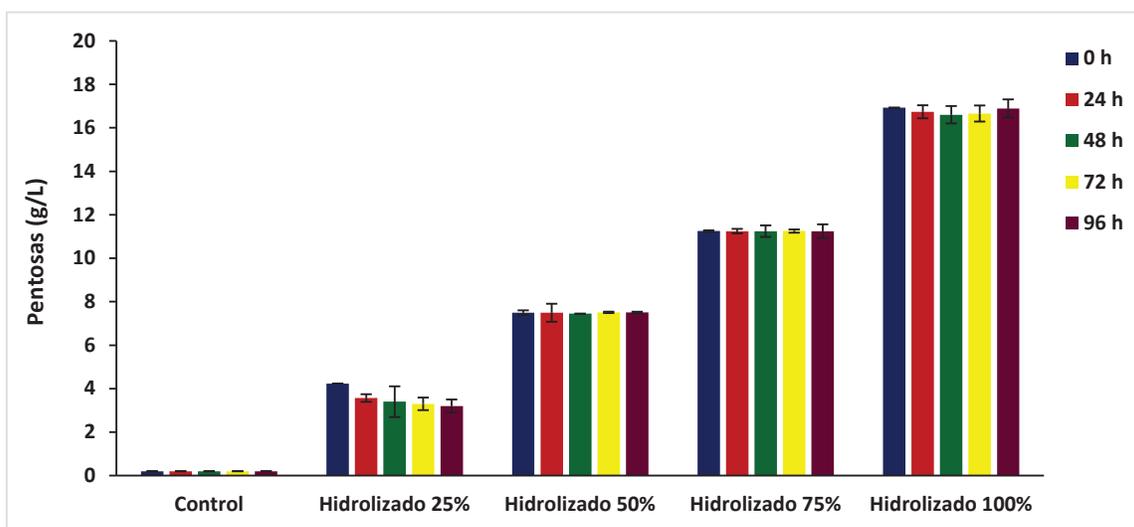
**Figura 31. Nivel de azúcares reductores en los cultivos con distintas concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz.** Nivel de azúcares reductores durante el cultivo del consorcio bacteriano en distintas concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz sin detoxificar (25 %, 50 %, 75 % y 100 % v/v). El control corresponde a cultivos del consorcio realizados en medio definido de Logan.

Con respecto a las mediciones de glucosa, se observa en la **Figura 32** que se registró un consumo de este azúcar únicamente en los cultivos efectuados en 25 % (v/v) de hidrolizado y en los cultivos control. Los valores del consumo de glucosa corresponden a 7,6 g/L para los cultivos en 25 % (v/v) de hidrolizado y a 11,4 g/L para los cultivos control, siendo este último valor prácticamente la totalidad de glucosa medida inicialmente. Debido a que la glucosa fue la única fuente de carbono en los cultivos control, era de esperar que el valor de consumo de glucosa coincidiera con el consumo de azúcares reductores. Además, se observó que en los cultivos llevados a cabo en hidrolizados a concentraciones de 50 %, 75 % y 100 % (v/v), no se generó consumo de glucosa durante la incubación.



**Figura 32. Nivel de glucosa en los cultivos con distintas concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz.** Nivel de glucosa durante el cultivo del consorcio bacteriano en distintas concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz sin detoxificar (25 %, 50 %, 75 % y 100 % v/v). El control corresponde a cultivos del consorcio realizados en medio definido de Logan.

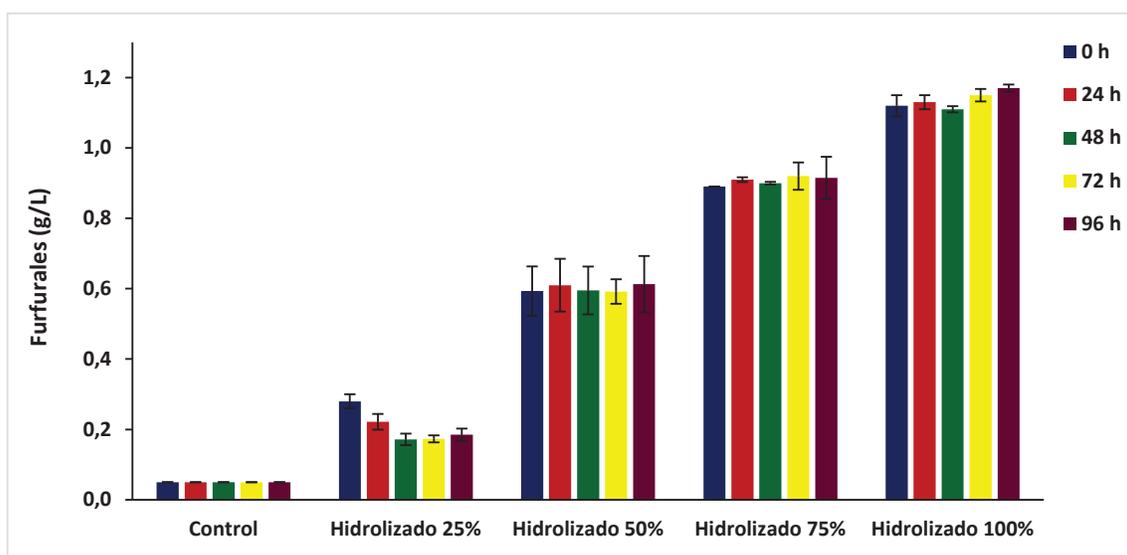
La **Figura 33** evidencia que ocurrió consumo de pentosas únicamente en los cultivos realizados en 25 % (v/v) de hidrolizado, con un valor aproximado de 1 g/L de pentosas consumidas. Este consumo de pentosas, sumado al consumo de glucosa, resulta aproximado a la concentración de azúcares reductores consumidos por el cultivo en hidrolizado de cáscara de arroz al 25 % (v/v). La ausencia de consumo de pentosas, como así también de glucosa, en los cultivos llevados a cabo en hidrolizados a concentraciones de 50 %, 75 % y 100 % (v/v), permitió corroborar el valor nulo de consumo de azúcares reductores en estos cultivos.



**Figura 33. Nivel de pentosas en los cultivos con distintas concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz.** Nivel de pentosas durante el cultivo del consorcio bacteriano en distintas concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz sin detoxificar (25 %, 50 %, 75 % y 100 % v/v). El control corresponde a cultivos del consorcio realizados en medio definido de Logan.

Cabe remarcar que, la ausencia de consumo de azúcares reductores, glucosa y pentosas en los cultivos realizados en hidrolizados al 50 %, 75 % y 100 % (v/v), sugiere que los hidrolizados de cáscara de arroz a dichas concentraciones, no son adecuados para un óptimo crecimiento del consorcio bacteriano. La falta de consumo de nutrientes y por ende de crecimiento del consorcio en 50 %, 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado, podría estar causada por la elevada concentración de compuestos tóxicos o inhibidores microbianos presentes en los hidrolizados, como ser furfurales y fenoles. Por tal motivo, se decidió aplicar un tratamiento de detoxificación al hidrolizado de cáscara de arroz para disminuir los niveles de dichos compuestos inhibidores.

A continuación, la **Figura 34** detalla los valores obtenidos a partir de la cuantificación de furfurales a lo largo de la incubación de los distintos cultivos. Así, se puede observar que existió una leve disminución de la concentración de furfurales durante la incubación de los cultivos realizados en 25 % (v/v) de hidrolizado, de aproximadamente 0,1 g/L, lo que representa una reducción del 32 % respecto al valor correspondiente al inicio de la incubación. Por otro lado, en los cultivos efectuados en 50 %, 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado no se observaron variaciones significativas en la concentración de furfurales durante la incubación.



**Figura 34. Nivel de furfurales en los cultivos con distintas concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz.** Nivel de furfurales durante el cultivo del consorcio bacteriano en distintas concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz sin detoxificar (25 %, 50 %, 75 % y 100 % v/v). El control corresponde a cultivos del consorcio realizados en medio definido de Logan.

Estos resultados confirman que el consorcio bacteriano consiguió una óptima actividad metabólica únicamente en el hidrolizado de cáscara de arroz al 25 % (v/v) de concentración, por lo que se presentó como necesaria la detoxificación de los hidrolizados de cáscara de arroz para ser utilizados a concentraciones mayores (50 %, 75 % y 100 % v/v).

En la **Tabla 8** se indican los valores de pH registrados a lo largo de la incubación de los distintos cultivos del consorcio. Para los cultivos control y cultivos realizados en 25 % (v/v) de hidrolizado se determinó una disminución del pH hasta valores cercanos a 4,15, lo cual es compatible con el metabolismo acidogénico de la fermentación oscura, el cual genera hidrógeno como producto. Mientras que, para los cultivos efectuados en 50 %, 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado se registró un aumento de pH, lo cual se condice con un metabolismo solventogénico, de la fermentación oscura, que no genera hidrógeno como producto final. Cabe mencionar que, el aumento del pH en estos últimos cultivos sería resultado del consumo de ácidos presentes en los hidrolizados, como el ácido acético, para producir solventes como la acetona.

Ensayo	pH 0 h	pH 24 h	pH 48 h	pH 72 h	pH 96 h
Control	6	5	5	4	4,13 ± 0,01
Hidrolizado 25 %	6	6	5	4	4,16 ± 0,03
Hidrolizado 50 %	6	6	6	6	6,45 ± 0,02
Hidrolizado 75 %	6	6	7	7	6,86 ± 0,02
Hidrolizado 100 %	6	6	6	7	7,7 ± 0,2

**Tabla 8. Variación del pH en los cultivos con distintas concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz.** Valores de pH durante el cultivo del consorcio bacteriano en distintas concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz sin detoxificar (25 %, 50 %, 75 % y 100 % v/v). El control corresponde a cultivos del consorcio realizados en medio definido de Logan.

#### 4.8. Detoxificación del hidrolizado lignocelulósico de cáscara de arroz

Debido que, a partir de los cultivos del consorcio realizados en hidrolizado al 50 %, 75 % y 100 % (v/v) de concentración no se registró metabolismo acidogénico, se llevó a cabo un proceso de detoxificación del hidrolizado lignocelulósico de cáscara de arroz, para luego evaluar dicho hidrolizado detoxificado en un ensayo de crecimiento microbiano y producción de hidrógeno. En la **Tabla 9** se indican las concentraciones de azúcares reductores, glucosa, pentosas y fenoles correspondientes al hidrolizado sin detoxificar y luego de las etapas del procedimiento de detoxificación, es decir *overliming* (sobrealcalinización) y tratamiento con carbón activado. Asimismo, en esta tabla se indica la composición del hidrolizado detoxificado luego de aplicarle el tratamiento de pasteurización.

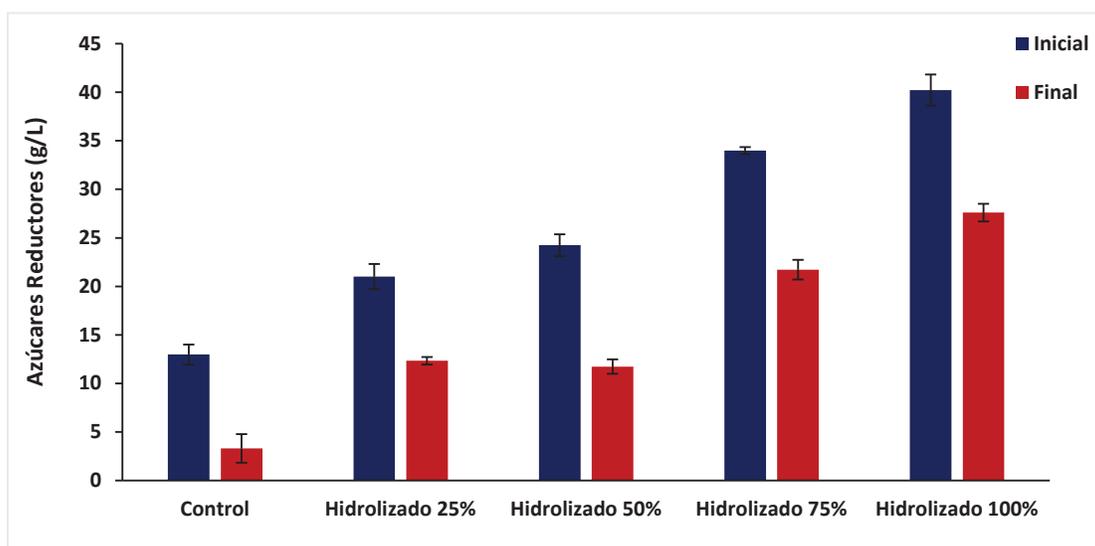
Compuesto	Hidrolizado sin detoxificar	Hidrolizado luego del tratamiento de <i>overliming</i>	Hidrolizado luego de tratamiento con carbón activado	Hidrolizado luego de la pasteurización
Azúcares reductores	48 g/L ± 2 g/L	49 g/L ± 3 g/L	49 g/L ± 2 g/L	51 g/L ± 2 g/L
Glucosa	5,3 g/L ± 0,6 g/L	5,4 g/L ± 0,6 g/L	5,4 g/L ± 0,7 g/L	5,2 g/L ± 0,3 g/L
Pentosas	26,5 g/L ± 0,9 g/L	25,6 g/L ± 0,6 g/L	24,6 g/L ± 0,6 g/L	26,5 g/L ± 0,5 g/L
Furfurales	4,1 g/L ± 0,1 g/L	2,55 g/L ± 0,06 g/L	0,59 g/L ± 0,07 g/L	0,6 g/L ± 0,1 g/L
Fenoles	0,7 g/L ± 0,1 g/L	0,6 g/L ± 0,2 g/L	0,29 g/L ± 0,05 g/L	0,31 g/L ± 0,07 g/L

**Tabla 9. Composición del hidrolizado de cáscara de arroz en distintas etapas del tratamiento de detoxificación y luego de la pasteurización.** Concentraciones de glucosa, azúcares reductores, pentosas, furfurales y fenoles correspondientes al hidrolizado de cáscara de arroz sin detoxificar, y luego de los tratamientos de *overliming*, y con carbón activado, y después de la pasteurización.

Es importante resaltar que ambas etapas del procedimiento de detoxificación no generaron una disminución de la concentración de azúcares reductores, glucosa y pentosas del hidrolizado, es decir que el tratamiento de detoxificación no elimina estos compuestos del hidrolizado. Sin embargo, cabe remarcar que a partir del tratamiento de detoxificación se registró una notoria disminución de la concentración de furfurales y fenoles en el hidrolizado. Es decir, la concentración de furfurales se redujo alrededor de 38% con el procedimiento de *overliming* y 77 % con el tratamiento con carbón activado, presentando una reducción total de 85,6 % en la concentración de furfurales luego del proceso completo de detoxificación. Con respecto a la concentración de fenoles, su reducción no fue significativa con la etapa de *overliming*, mientras que, con el tratamiento con carbón activado, dicha concentración disminuyó alrededor de 60 %. Asimismo, se determinó que el procedimiento de pasteurización no afectó notoriamente la concentración de los distintos compuestos analizados. Es decir que, mediante el proceso de detoxificación se consiguió disminuir significativamente las concentraciones de furfurales y fenoles en el hidrolizado de cáscara de arroz, pero sin generar una variación significativa en sus niveles de azúcares reductores, glucosa y pentosas, por lo que en la siguiente sección se evaluó la producción de biohidrógeno utilizando hidrolizado de cáscara de arroz detoxificado.

#### 4.9. Ensayos de crecimiento y producción de biohidrógeno en frascos *Erlenmeyer*

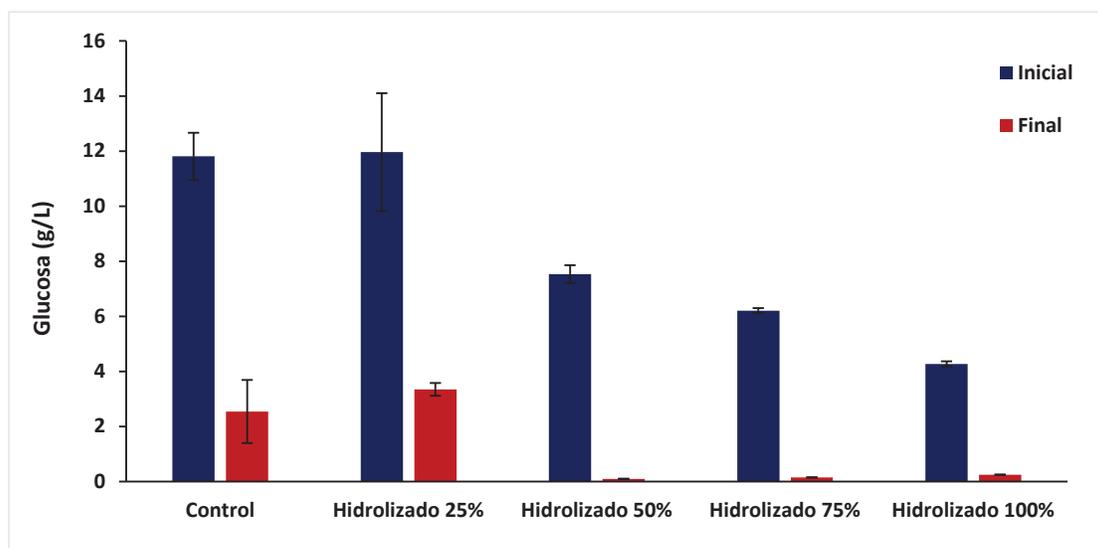
El crecimiento y producción de biohidrógeno se evaluó a partir de cultivos del consorcio bacteriano realizados en frascos *Erlenmeyer* con hidrolizado sin detoxificar al 25 % (v/v) en medio definido Logan, hidrolizado detoxificado al 50 % y 75 % (v/v) en medio definido Logan, hidrolizado detoxificado puro (100 % v/v) y medio definido de Logan (control). Para tal fin, se determinó el consumo de azúcares reductores, glucosa, y pentosas, como así también la variación del nivel de furfurales en los distintos cultivos realizados. Así, en la **Figura 35** se muestran los resultados del consumo de azúcares reductores, observando que en todos los cultivos se registró consumo de estos, lo cual indica que el consorcio bacteriano fue capaz de crecer en todas las condiciones evaluadas. Los cultivos que exhibieron mayor consumo de azúcares reductores fueron los que crecieron en 50 %, 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado, los cuales presentaron valores cercanos a 12,5 g/L de azúcares reductores consumidos. Por otra parte, los cultivos realizados en 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar presentaron un valor cercano a 8,5 g/L de azúcares reductores consumidos, mientras que los cultivos en medio de Logan (control) exhibieron un consumo de 9,5 g/L de azúcares reductores.



**Figura 35. Consumo de azúcares reductores en cultivos a escala *Erlenmeyer* con distintas concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz.** Nivel de azúcares consumidos en cultivos del consorcio bacteriano realizados en frascos *Erlenmeyer* con 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar, y con 50 %, 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado. El control corresponde a cultivos del consorcio realizados en medio definido de Logan.

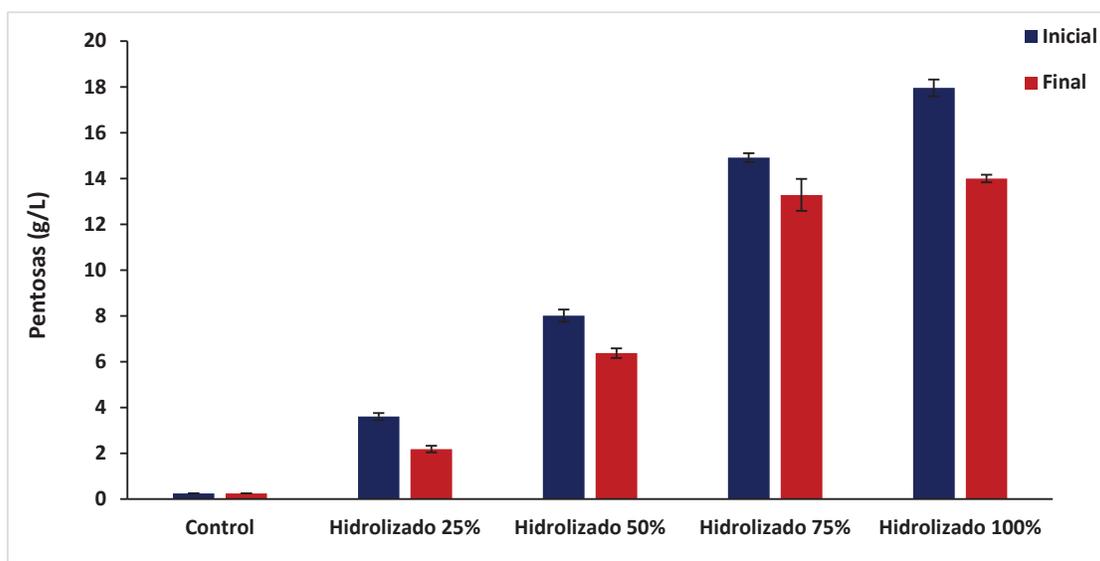
A partir de las mediciones de glucosa (**Figura 36**), se pudo verificar el consumo de este sustrato en todos los cultivos realizados. Así, se observó que en los cultivos efectuados con 50 %, 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado se consumió la totalidad de la concentración inicial de glucosa, siendo este valor 7,5 g/L, 6,2 g/L y 4,3 g/L, respectivamente. Por otra parte, en los cultivos realizados con

25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar, el consumo de glucosa fue 8,6 g/L, con una concentración residual de 3,3 g/L. Asimismo, se determinó que en los cultivos crecidos en medio definido de Logan (control) el consumo de glucosa fue 9,3 g/L, con una concentración remanente de 2,5 g/L. Como se esperaba, en los cultivos control el consumo de glucosa fue similar al consumo de azúcares reductores, debido a que dicho monosacárido es el único azúcar reductor que contiene el medio definido de Logan. A su vez, se pudo confirmar que el medio de Logan aportó mayor cantidad de glucosa que el hidrolizado lignocelulósico, debido a que en los cultivos realizados con menor porcentaje de hidrolizado se registró mayor concentración inicial de glucosa.



**Figura 36. Consumo de glucosa en cultivos a escala Erlenmeyer con distintas concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz.** Nivel de glucosa en cultivos del consorcio bacteriano realizados en frascos *Erlenmeyer* con 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar, y con 50 %, 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado. El control corresponde a cultivos del consorcio realizados en medio definido de Logan.

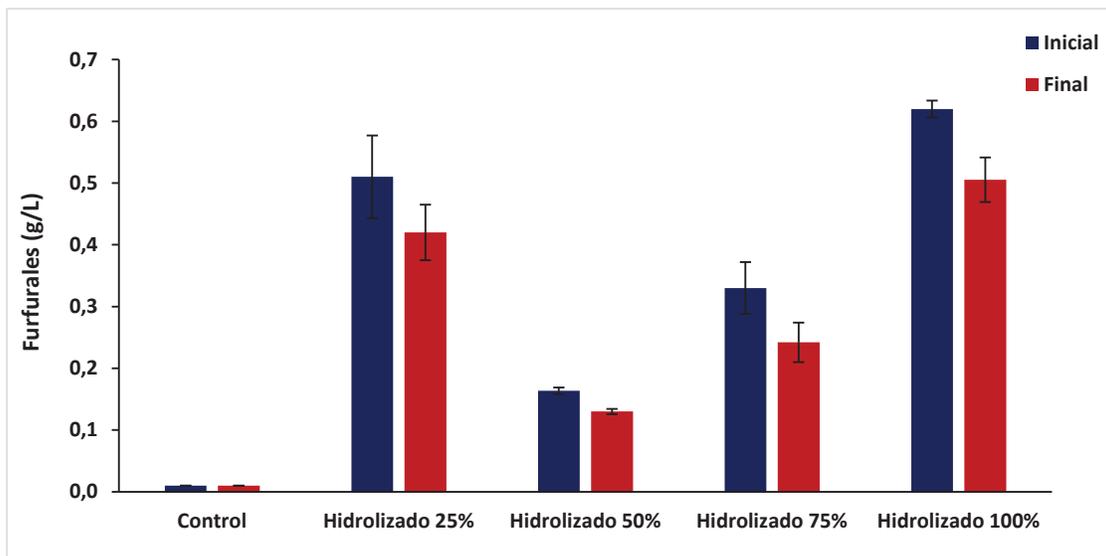
Asimismo, en la **Figura 37** se muestran los resultados del consumo de pentosas correspondientes a los distintos cultivos del consorcio bacteriano. Tal como se indica en esta Figura, los hidrolizados lignocelulósicos de cáscara de arroz aportaron una considerable cantidad de pentosas al medio en comparación con la cantidad de glucosa, mientras que el medio definido de Logan no contiene dicho sustrato. En los cultivos realizados con hidrolizado detoxificado puro (100 % v/v) se registró el mayor consumo de pentosas, con un valor de 4 g/L de pentosas consumidas, mientras que el consumo de pentosas fue cercano a 1,6 g/L en los cultivos realizados con 50 % y 75 % (v/v) de hidrolizado detoxificado, y 1,4 g/L con 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar. Cabe resaltar que las pentosas, entre ellas la xilosa, puede ser utilizada como sustrato en las vías metabólicas de producción de hidrógeno mediante el proceso de fermentación oscura.



**Figura 37. Consumo de pentosas en cultivos a escala *Erlenmeyer* con distintas concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz.** Nivel de pentosas en cultivos del consorcio bacteriano realizados en frascos *Erlenmeyer* con 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar, y con 50 %, 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado. El control corresponde a cultivos del consorcio realizados en medio definido de Logan.

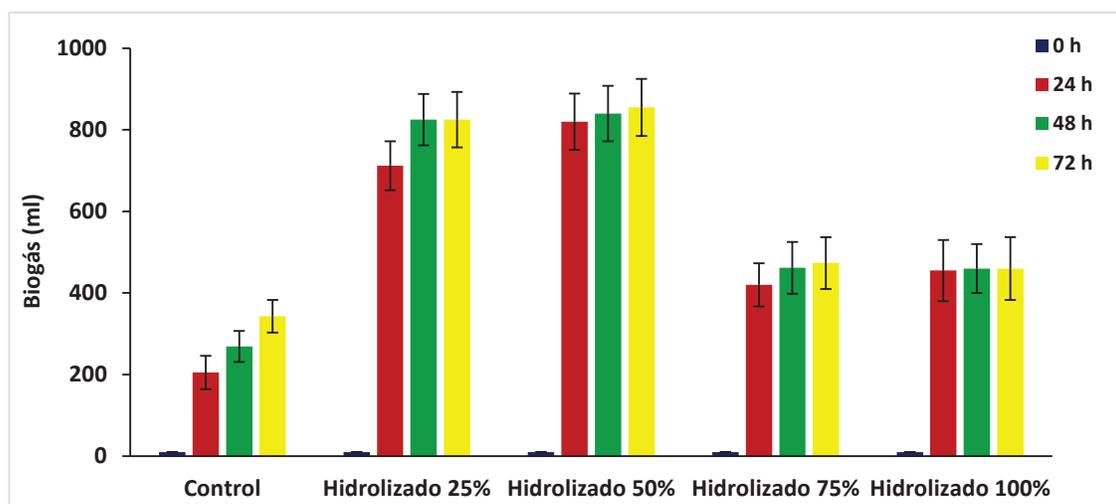
Es importante remarcar que, las diferencias observadas entre los valores de consumo de azúcares reductores y la sumatoria de los consumos de glucosa y pentosas, indican que el consorcio bacteriano presentaría la capacidad de consumir otros azúcares reductores presentes en el hidrolizado de cáscara de arroz además de glucosa y pentosas.

En la **Figura 38** se muestran los resultados de la variación de la concentración de furfurales correspondientes a los distintos cultivos del consorcio bacteriano. Así, se puede observar que se generó un leve descenso en la concentración de furfurales de aproximadamente 0,1 g/L al final de la incubación, para los cultivos realizados en 25 %, 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado, mientras que en los cultivos realizados en 50 % (v/v) de hidrolizado, el descenso de la concentración de furfurales fue cercano a 0,03 g/L. Estos resultados sugieren que, ciertas bacterias del consorcio bacteriano podrían presentar la capacidad de incorporar o degradar los furfurales generados a partir de las pentosas durante el tratamiento de hidrólisis ácida, registrándose por tal motivo una disminución de la concentración de estos compuestos tóxicos o inhibidores en los hidrolizados de cáscara de arroz (Akobi *et al.*, 2016). Asimismo, fue de esperar que no se registrara presencia de furfurales en los cultivos realizados en medio de Logan (control), ya que a diferencia de los hidrolizados este medio no contiene pentosas en su composición y no fue sometido a tratamiento de hidrólisis ácida.



**Figura 38. Variación de la concentración de furfurales en cultivos a escala *Erlenmeyer* con distintas concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz.** Nivel de furfurales en cultivos del consorcio bacteriano en frascos *Erlenmeyer* con 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar, y con 50 %, 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado. El control corresponde a cultivos del consorcio realizados en medio definido de Logan.

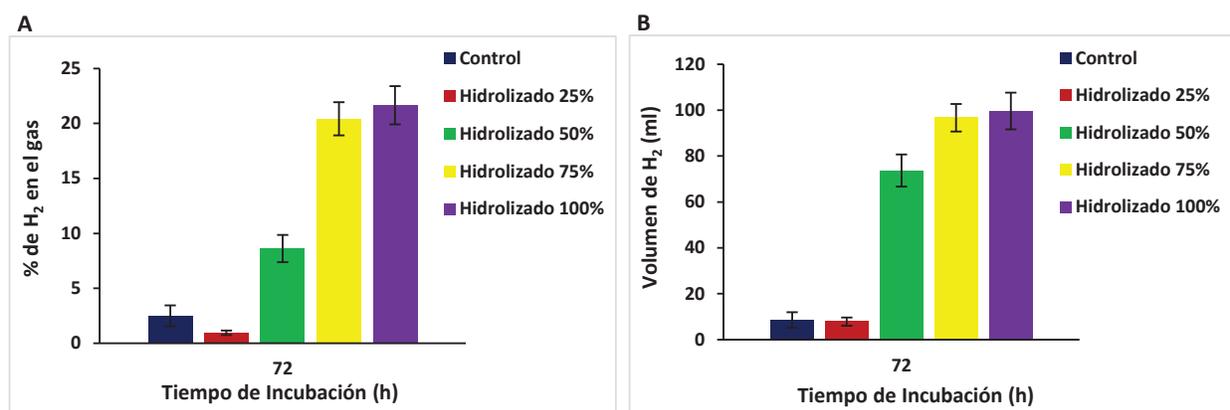
En la **Figura 39** se indican los volúmenes de biogás obtenido a partir de los distintos cultivos del consorcio bacteriano y recolectado mediante el sistema de probetas invertidas. Así, se puede observar que mediante los cultivos realizados en 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar y 50 % (v/v) de hidrolizado detoxificado, se alcanzó el máximo nivel de producción de biogás, con un valor promedio cercano a 800 ml. Este nivel máximo de biogás producido se consiguió a partir de las 24 h de incubación para ambos hidrolizados mencionados. Asimismo, los cultivos efectuados con 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado generaron un volumen de biogás promedio cercano a 450 ml, alcanzando este valor de producción de biogás también desde las 24 h de incubación.



**Figura 39. Biogás producido durante los cultivos a escala *Erlenmeyer* con diferentes concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz.** Nivel de biogás obtenido durante los cultivos del consorcio bacteriano en frascos *Erlenmeyer* con 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar, y con 50 %, 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado. El control corresponde a cultivos del consorcio realizados en medio definido de Logan.

Por otro lado, los cultivos realizados en medio de Logan (control) produjeron un volumen máximo de biogás de 340 ml, a las 72 h de incubación, valor significativamente menor al volumen máximo alcanzado por los cultivos efectuados en hidrolizado de cáscara de arroz (**Figura 39**).

A partir del biogás producido mediante los distintos cultivos realizados con hidrolizado de cáscara de arroz, se llevó a cabo la cuantificación del hidrógeno presente en dicho gas al final de la incubación (72 h de proceso). Así, en la **Figura 40 A** se pueden observar los valores de porcentaje de hidrógeno en el biogás producido, para los cultivos efectuados con hidrolizado y con medio definido de Logan (Control). Mediante los cultivos llevados a cabo con 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado se logró alcanzar el mayor porcentaje de hidrógeno respecto a todos los cultivos realizados, siendo este valor cercano a 21 % de H<sub>2</sub> en el biogás generado. A partir de los cultivos efectuados en 50 % (v/v) de hidrolizado detoxificado se consiguió un porcentaje de hidrógeno en el biogás de aproximadamente 8,6 %, mientras que con los cultivos realizados en 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar se obtuvo cerca de 1 % de H<sub>2</sub>. En cuanto a los cultivos control, estos produjeron en promedio 2,5 % de H<sub>2</sub> en el biogás, es decir aproximadamente 8 veces menos que el porcentaje máximo de hidrógeno alcanzado a partir de los hidrolizados. Por otra parte, en la **Figura 40 B** se exhiben los valores de volumen de hidrógeno producido a partir de los distintos cultivos. Así, por medio de los cultivos realizados en 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado se consiguió obtener el mayor volumen de hidrógeno, siendo este de aproximadamente 100 ml. Por otro lado, a partir de los cultivos efectuados con 50 % (v/v) de hidrolizado detoxificado se obtuvieron 74 ml de hidrógeno, mientras que con los cultivos realizados en 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar y en medio de Logan (control) se produjeron aproximadamente 9 ml de hidrógeno, es decir cerca de 11 veces menos respecto al volumen máximo de hidrógeno obtenido con los hidrolizados.



**Figura 40. Biohidrógeno producido mediante los cultivos a escala Erlenmeyer con diferentes concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz. A:** Porcentaje de hidrógeno presente en el gas total producido y **B:** volumen de hidrógeno (ml) presente en el gas total producido, al final de los cultivos (72 h de incubación) del consorcio bacteriano realizados en frascos Erlenmeyer con 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar, y con 50 %, 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado. El control corresponde a cultivos del consorcio realizados en el medio definido de Logan.

A partir de los valores de volumen de hidrógeno obtenidos por los cultivos a las 72 h de incubación se calcularon distintos parámetros de producción de hidrógeno, los cuales se resumen en la **Tabla 10**. Así, se puede observar que mediante los cultivos efectuados con 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado se alcanzaron los mayores valores de concentración de hidrógeno (32 - 33 mg H<sub>2</sub>/L cultivo), productividad volumétrica al final del proceso (0,44 - 0,46 mg H<sub>2</sub>/Lh), productividad total (0,11 mg H<sub>2</sub>/h), y rendimiento de hidrógeno respecto a los azúcares reductores consumidos (2,58 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub>), en comparación con los cultivos realizados con 25 % y 50 % (v/v) de hidrolizado y respecto al control. Por otro lado, los cultivos efectuados con 50 % y 75 % (v/v) de hidrolizado detoxificado presentaron los mayores valores de rendimiento de H<sub>2</sub> en función de la cantidad de cáscara de arroz utilizada para la obtención de cada hidrolizado (0,07 y 0,06 mg H<sub>2</sub>/g<sub>sustrato</sub>, respectivamente).

Cultivos	Concentración de Hidrógeno (mg H <sub>2</sub> /L cultivo)	Productividad Volumétrica (mg H <sub>2</sub> /L h)	Productividad Total (mg H <sub>2</sub> /h)	Rendimiento de Hidrógeno (mg H <sub>2</sub> /g <sub>az. red.</sub> )	Rendimiento de Hidrógeno (mg H <sub>2</sub> /g <sub>sustrato</sub> )
Control	3	0,04	0,01	0,32	-
Hidrolizado 25 %	3	0,04	0,01	0,30	0,03
Hidrolizado 50 %	24	0,33	0,08	1,93	0,07
Hidrolizado 75 %	32	0,44	0,11	2,58	0,06
Hidrolizado 100 %	33	0,46	0,11	2,58	0,05

**Tabla 10. Parámetros de producción de hidrógeno para los cultivos a escala Erlenmeyer con diferentes concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz.** Se indican los parámetros concentración (mg H<sub>2</sub>/L cultivo), productividad volumétrica (mg H<sub>2</sub>/L h), productividad total (mg H<sub>2</sub>/h), rendimiento en función de los azúcares reductores consumidos (mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub>) y rendimiento en función de la cantidad de cáscara de arroz utilizada (mg H<sub>2</sub>/g<sub>sustrato</sub>), para los cultivos realizados en frascos Erlenmeyer con 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar, y con 50 %, 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado. El control corresponde a cultivos del consorcio efectuados en medio definido de Logan.

Asimismo, se determinaron los valores iniciales y finales de pH de los distintos cultivos, los cuales se resumen en la **Tabla 11**. Así, se puede observar que el pH disminuyó en todos los cultivos efectuados con los hidrolizados de cáscara de arroz, como así también en los realizados en medio definido de Logan (control). Esta acidificación de los cultivos indica que el consorcio bacteriano presentó un metabolismo acidogénico consistente con la producción de hidrógeno, tanto en los cultivos llevados a cabo en los hidrolizados como en el medio de Logan (control). En particular, los cultivos realizados en hidrolizados que exhibieron un mayor descenso del pH, es decir mayor acidificación, fueron los efectuados en 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado, con valores finales de pH de 4,42 y 4,48, respectivamente. Por otro lado, los cultivos que presentaron menor acidificación fueron los realizados

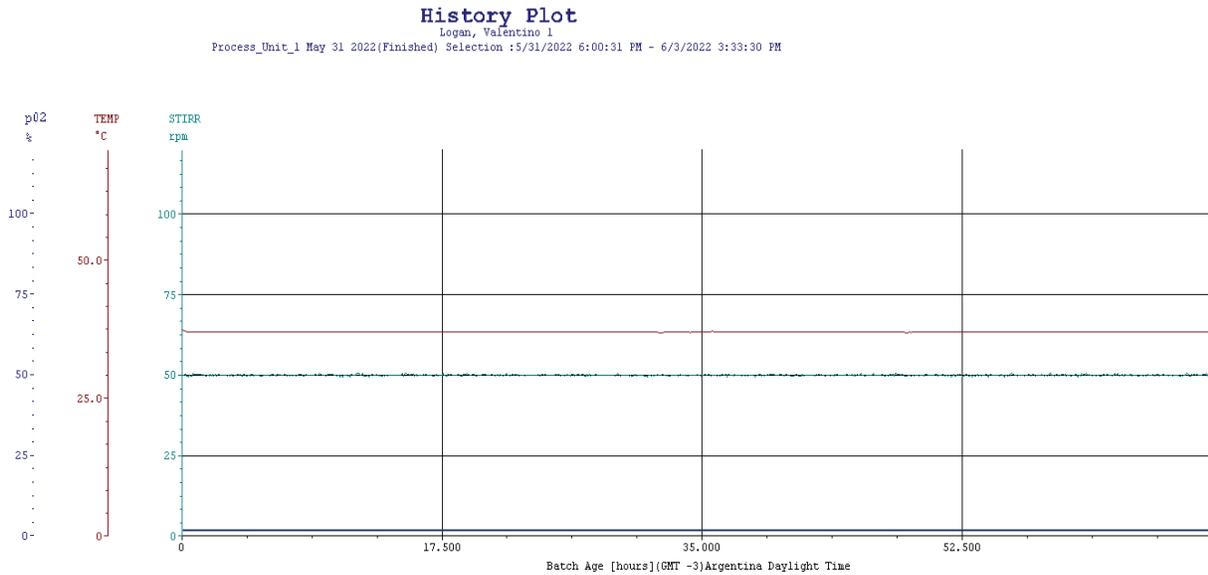
en 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar (pH final: 4,70), debido probablemente al menor consumo de azúcares reductores registrado en dichos cultivos.

Cultivos	pH inicial	pH final
Control	6	4,2 ± 0,2
Hidrolizado 25 %	6	4,70 ± 0,03
Hidrolizado 50 %	6	4,59 ± 0,02
Hidrolizado 75 %	6	4,42 ± 0,01
Hidrolizado 100 %	6	4,48 ± 0,02

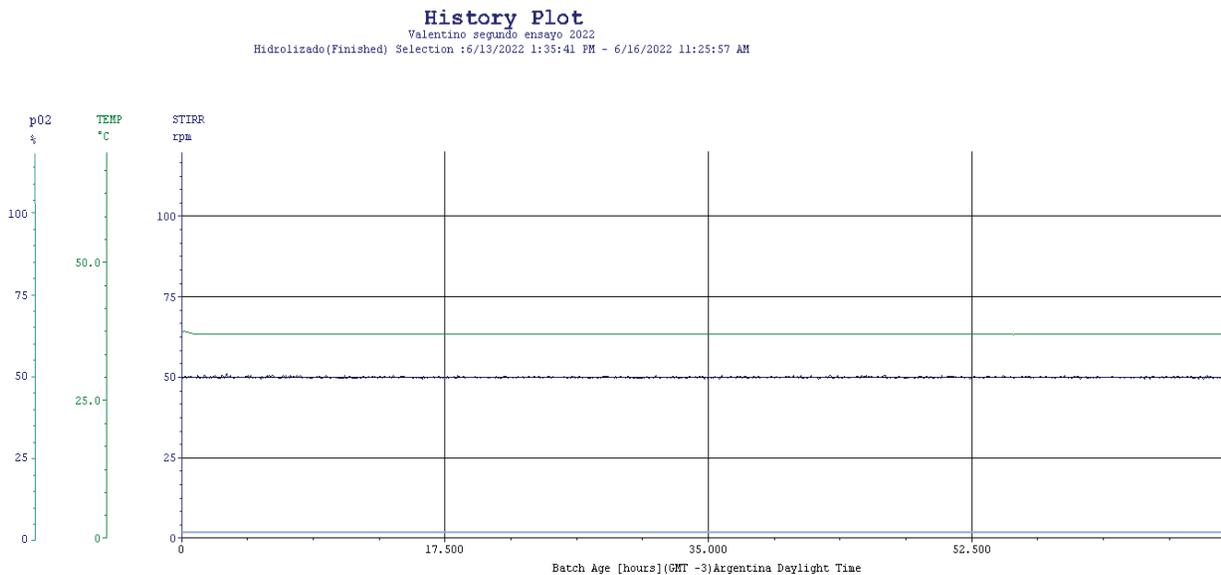
**Tabla 11. Valores de pH de los cultivos a escala *Erlenmeyer* con diferentes concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz.** Se indican los valores de pH al inicio y al final de los cultivos del consorcio bacteriano realizados en frascos *Erlenmeyer* con 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar, y con 50 %, 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado. El control corresponde a los cultivos del consorcio efectuados en medio definido de Logan.

#### 4.10. Escalado de la producción de hidrógeno mediante fermentaciones en biorreactor

Debido a que los cultivos realizados en 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado fueron los que obtuvieron los mejores parámetros de producción de hidrógeno a escala *Erlenmeyer*, se decidió seleccionar al hidrolizado detoxificado puro (100 % v/v) para efectuar el escalado de la producción de hidrógeno mediante fermentaciones en biorreactor. Dicha selección se basó en el objetivo de disminuir el uso de medio definido de Logan en la producción de hidrógeno y reemplazarlo por hidrolizado lignocelulósico, con el fin de reducir los costos del proceso de producción. Por esta razón, a continuación, se muestran los resultados obtenidos a partir de las fermentaciones del consorcio microbiano en biorreactor de tanque agitado de 5 L utilizando hidrolizado de cáscara de arroz detoxificado puro (100 % v/v) y medio definido de Logan como control del proceso de fermentación. Así, las **Figuras 41 y 42** corresponden a los perfiles de parámetros de las fermentaciones efectuadas en biorreactor agitado de 5 L con medio definido de Logan y con hidrolizado detoxificado puro, respectivamente. Tal como se puede observar en dichos perfiles, durante ambas fermentaciones se mantuvieron constantes los valores de temperatura y agitación, en 37°C y 50 rpm, respectivamente. Asimismo, para ambos perfiles se puede apreciar que se logró mantener el O<sub>2</sub> disuelto de los cultivos en valores cercanos a 0 % durante las fermentaciones, luego de aplicar un flujo de N<sub>2</sub> al inicio del proceso para tal fin.

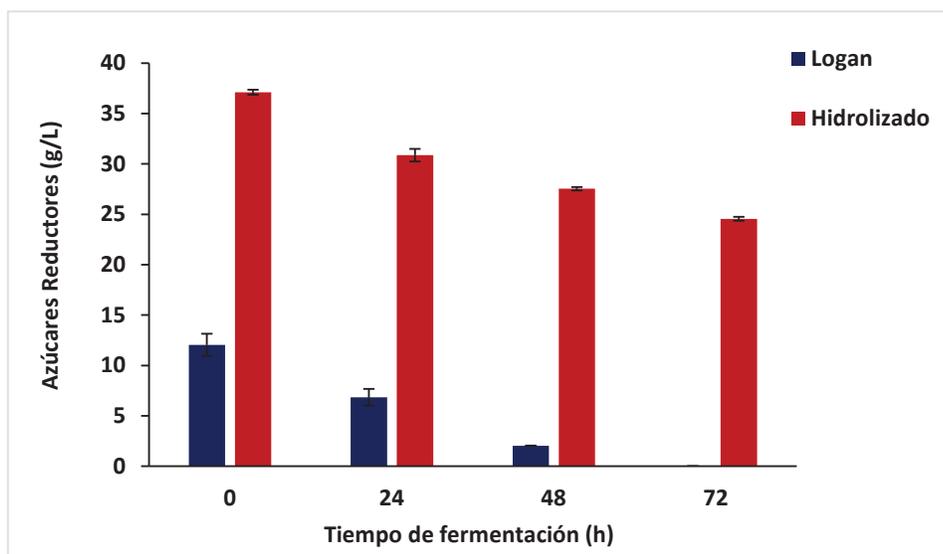


**Figura 41. Perfil de parámetros de fermentación en biorreactor con medio definido de Logan.** Valores de  $O_2$  disuelto ( $O_2d$  %, línea azul), temperatura ( $^{\circ}C$ , línea roja) y agitación (*Stirr rpm*, línea celeste) durante la fermentación del consorcio bacteriano en biorreactor de tanque agitado de 5 L con medio definido de Logan (control).



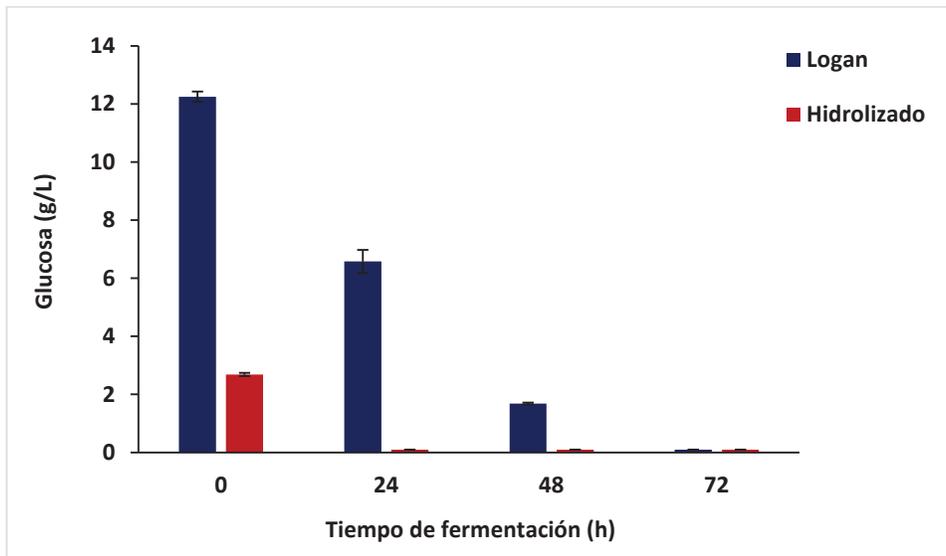
**Figura 42. Perfil de parámetros de fermentación en biorreactor con hidrolizado detoxificado puro.** Valores de  $O_2$  disuelto ( $O_2d$  %, línea celeste), temperatura ( $^{\circ}C$ , línea verde) y agitación (*Stirr rpm*, línea azul), durante la fermentación del consorcio bacteriano en biorreactor de tanque agitado de 5 L con 100 % (v/v) de hidrolizado de cáscara de arroz detoxificado.

Asimismo, en la **Figura 43** se indican los resultados del consumo de azúcares reductores para ambas fermentaciones en biorreactor a distintos tiempos de proceso. Tal como en ensayos anteriores, se pudo determinar que el hidrolizado lignocelulósico presentó una mayor concentración de azúcares reductores respecto al medio definido de Logan. A partir de ambas fermentaciones se registró un claro consumo de azúcares reductores; en particular, este consumo fue total para la fermentación en medio de Logan, con un valor de 12 g/L de azúcares reductores consumidos al final del proceso (72 h). Por otro lado, para la fermentación en hidrolizado detoxificado puro, el consumo de azúcares reductores fue 12,6 g/L al final del proceso, con un remanente de 24,6 g/L de azúcares reductores.



**Figura 43. Consumo de azúcares reductores en las fermentaciones a escala biorreactor.** Concentraciones de azúcares reductores durante las fermentaciones del consorcio bacteriano en biorreactor de tanque agitado con medio definido de Logan como control (barras azules) y 100 % (v/v) de hidrolizado de cáscara de arroz detoxificado (barras rojas).

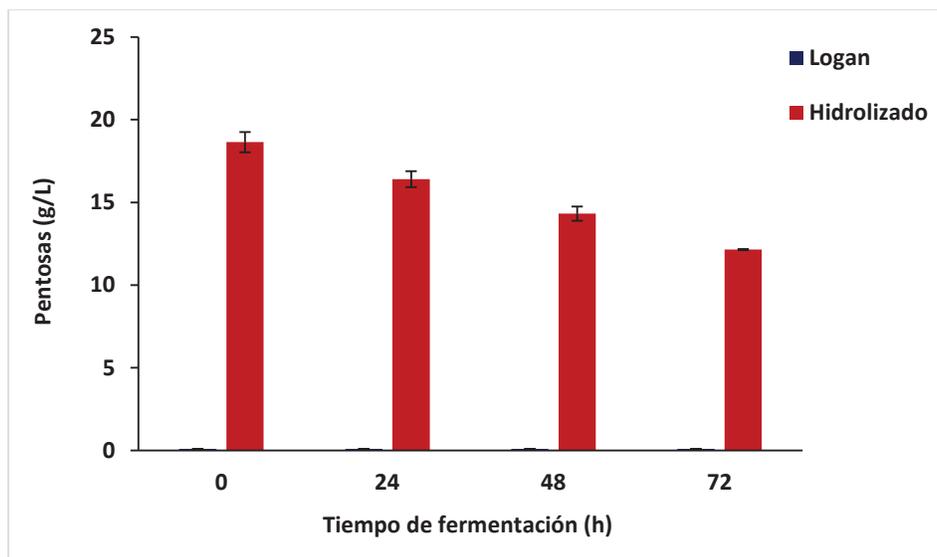
Con respecto a las mediciones de glucosa (**Figura 44**), también se determinó que en ambas fermentaciones llevadas a cabo en biorreactor ocurrió un consumo de este sustrato. Para el caso de la fermentación realizada con medio definido de Logan, este consumo fue equivalente al de azúcares reductores debido a que la glucosa fue el único azúcar reductor presente en este medio, es decir se consumieron cerca de 12 g/L de glucosa dentro de las 72 h de fermentación. Por otra parte, en la fermentación efectuada con hidrolizado detoxificado puro se registró el consumo total de la glucosa del hidrolizado (2,7 g/L), dentro de las 24 h de iniciado el proceso fermentativo.



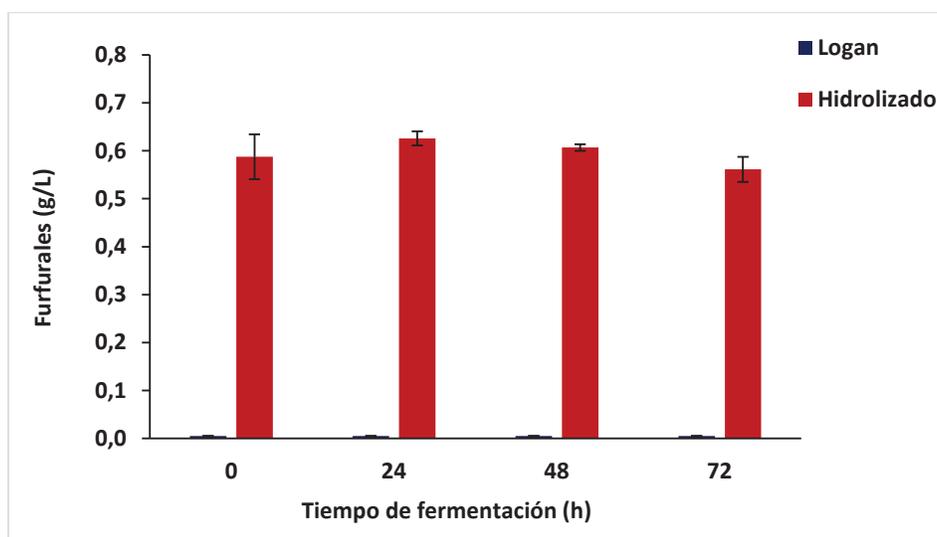
**Figura 44. Consumo de glucosa en las fermentaciones a escala biorreactor.** Concentraciones de glucosa durante las fermentaciones del consorcio bacteriano en biorreactor de tanque agitado con medio definido de Logan como control (barras azules) y 100 % (v/v) de hidrolizado de cáscara de arroz detoxificado (barras rojas).

Asimismo, en la **Figura 45** se exponen los resultados de las concentraciones de pentosas durante ambas fermentaciones en biorreactor a diferentes tiempos de cultivo. Así, se puede observar que en la fermentación realizada con hidrolizado detoxificado puro se consumieron 6,5 g/L de pentosas en 72 h de proceso. Cabe destacar que, este valor fue mayor al registrado para los cultivos en frascos *Erlenmeyer* que presentaron un consumo de pentosas de 4 g/L. Esto podría deberse a que, en las fermentaciones en biorreactor las condiciones de cultivo son más favorables en comparación con los cultivos en frascos *Erlenmeyer*, lo cual permite un mayor consumo de nutrientes como las pentosas. Por otro lado, como se esperaba, en la fermentación realizada en medio definido de Logan no se detectó pentosas en el medio.

Con relación a las mediciones de furfurales indicadas en la **Figura 46**, se puede notar que la fermentación realizada con hidrolizado detoxificado puro no presentó diferencias significativas en las concentraciones de furfurales a lo largo del proceso productivo. Es decir que, a diferencia con los cultivos en frascos *Erlenmeyer*, en la fermentación en biorreactor con hidrolizado no se registró una disminución en la concentración de furfurales a lo largo del tiempo. Esto podría deberse a que en esta fermentación hubo un mayor consumo de pentosas en comparación con los cultivos en *Erlenmeyer* y por ende el consorcio microbiano no necesitaría metabolizar otros compuestos como los furfurales. Por otro lado, como era esperable, no se detectaron furfurales durante la fermentación llevada a cabo con medio definido de Logan.



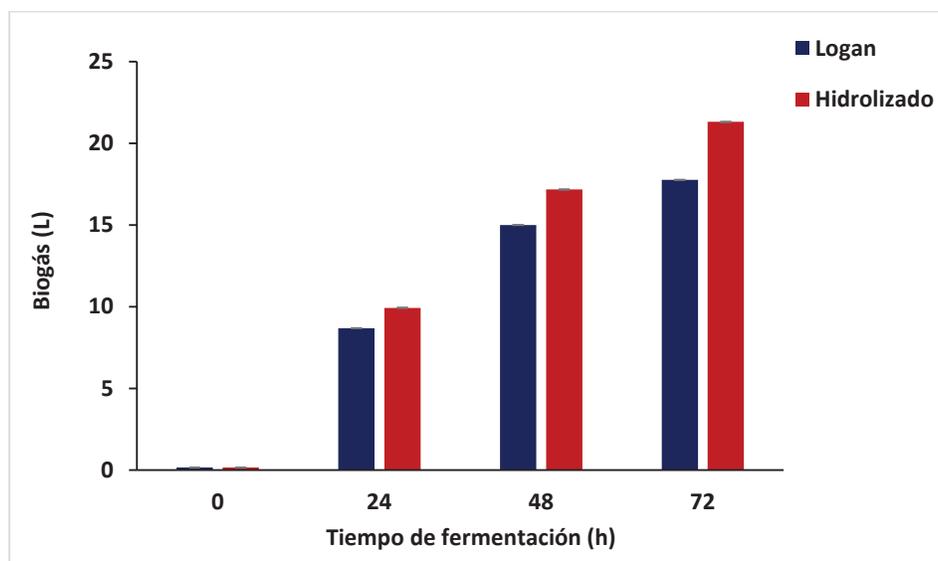
**Figura 45. Consumo de pentosas en las fermentaciones a escala biorreactor.** Concentraciones de pentosas durante las fermentaciones del consorcio bacteriano en biorreactor de tanque agitado con medio definido de Logan como control (barras azules) y 100 % (v/v) de hidrolizado de cáscara de arroz detoxificado (barras rojas).



**Figura 46. Nivel de furfurales en las fermentaciones a escala de biorreactor.** Concentraciones de furfurales durante las fermentaciones del consorcio bacteriano en biorreactor de tanque agitado con medio definido de Logan como control (barras azules) y 100 % (v/v) de hidrolizado de cáscara de arroz detoxificado (barras rojas).

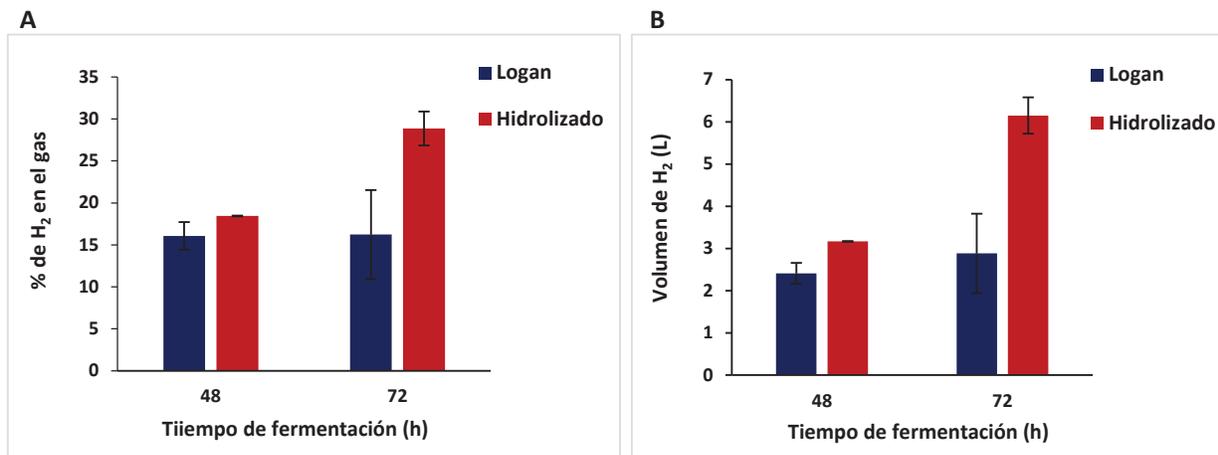
Asimismo, la producción de biogás durante las fermentaciones en biorreactor (**Figura 47**) aumentó en función del tiempo tanto con hidrolizado detoxificado puro como con medio definido de Logan, alcanzando sus valores máximos de producción al final del proceso (72 h de fermentación); a diferencia de los cultivos en frascos *Erlenmeyer* (**Figura 39**), donde la producción de gas alcanzó su máximo valor a las 24 h de incubación y luego se mantuvo constante hasta el final del cultivo (72 h de incubación). En particular, en las fermentaciones en biorreactor, ya sea con hidrolizado como con medio definido, se observó que a las 48 h de incubación se produjo en promedio un 73 % más de biogás que a las 24 h.

Luego de las 48 h de proceso, la producción de gas continuó para ambas fermentaciones, pero a una velocidad menor ya que a las 72 h el volumen de gas generado fue en promedio un 20 % superior que a las 48 h de proceso. Cabe detallar que, a partir de la fermentación realizada con hidrolizado detoxificado puro se logró alcanzar al final del proceso un volumen total de biogás de 21,3 L, mientras que con la fermentación en medio de Logan (control) se consiguió un volumen total de 17,8 L (**Figura 47**).



**Figura 47. Biogás producido mediante las fermentaciones a escala biorreactor.** Volumen de biogás producido durante las fermentaciones del consorcio bacteriano en biorreactor de tanque agitado con medio definido de Logan como control (barras azules) y 100 % (v/v) de hidrolizado de cáscara de arroz detoxificado (barras rojas).

En la **Figura 48 A y B** se indican los porcentajes de hidrógeno en el biogás producido y los volúmenes de hidrógeno obtenidos a las 48 h y 72 h de las 2 fermentaciones del consorcio bacteriano en biorreactor. Así, se determinó que la fermentación realizada en hidrolizado detoxificado puro alcanzó, para ambos tiempos evaluados, un mayor porcentaje de hidrógeno en el biogás, respecto a la fermentación en medio definido de Logan. En particular, a las 72 h de ambos procesos, mediante la fermentación con hidrolizado detoxificado puro se consiguió 29 % de  $H_2$  en el biogás, mientras que con la fermentación en medio definido se obtuvo 16 % de  $H_2$ , es decir que con hidrolizado se consiguió 1,8 veces más hidrógeno que con medio de Logan (**Figura 48 A**). Asimismo, cabe resaltar que, por medio de la fermentación realizada con hidrolizado detoxificado puro se logró la producción de 3,2 L y 6,2 L de hidrógeno a las 48 y 72 h, respectivamente, mientras que con la fermentación en medio de Logan se obtuvieron 2,4 L y 2,9 L de hidrógeno en los mismos tiempos (**Figura 48 B**).



**Figura 48. Biohidrógeno producido mediante las fermentaciones a escala biorreactor. A:** Porcentaje de hidrógeno en el gas generado y **B:** volumen de hidrógeno (L) producido, a las 48 y 72 h de las fermentaciones del consorcio bacteriano en biorreactor de tanque agitado con medio definido de Logan como control (barras azules) y 100 % (v/v) de hidrolizado de cáscara de arroz detoxificado (barras rojas).

A continuación, en la **Tabla 12** se indican los valores obtenidos para los siguientes parámetros de producción de hidrógeno calculados a partir de ambas fermentaciones del consorcio en biorreactor: concentración de hidrógeno (mg H<sub>2</sub>/L de cultivo), productividad volumétrica (mg H<sub>2</sub>/L h), productividad total (mg H<sub>2</sub>/h), rendimiento de hidrógeno en función de los azúcares reductores consumidos (mg H<sub>2</sub>/g de azúcares reductores) y rendimiento de hidrógeno en función de la cáscara de arroz utilizada para la obtención de cada hidrolizado (mg H<sub>2</sub>/g de sustrato). Así, a partir de la fermentación efectuada en hidrolizado detoxificado puro se alcanzaron valores superiores para todos los parámetros determinados, respecto a los conseguidos con la fermentación en medio definido de Logan, tanto a las 48 h como a las 72 h de proceso. Esta diferencia se manifiesta más notablemente a las 72 h de proceso, donde los valores de todos los parámetros de producción de H<sub>2</sub> para la fermentación en hidrolizado superaron aproximadamente en el doble a los valores correspondientes a la fermentación en medio definido. Además, cabe remarcar que para la fermentación con hidrolizado se consiguieron valores más elevados para todos los parámetros a las 72 h respecto a las 48 h de proceso. Así, cabe destacar que la productividad volumétrica, productividad total y rendimiento de hidrógeno en función de los azúcares reductores consumidos alcanzaron valores máximos de 1,4 mg H<sub>2</sub>/Lh, 7 mg H<sub>2</sub>/h y 8,0 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub>, respectivamente, mediante la fermentación con hidrolizado.

Por otro, para la fermentación en medio de Logan, el rendimiento de H<sub>2</sub> en función de los azúcares reductores consumidos se mantuvo constante luego de las 48 h de proceso, y la productividad volumétrica alcanzó su valor máximo de 0,8 mg H<sub>2</sub>/L h a dicho tiempo y luego a las 72 h descendió hasta 0,7 mg H<sub>2</sub>/L h.

Fermentación	Tiempo (h)	Concentración de Hidrógeno (mg H <sub>2</sub> /L)	Productividad Volumétrica (mg H <sub>2</sub> /L h)	Productividad Total (mg H <sub>2</sub> /h)	Rendimiento de H <sub>2</sub> (mg H <sub>2</sub> /g <sub>Az. Red.</sub> )	Rendimiento de H <sub>2</sub> (mg H <sub>2</sub> /g <sub>sustrato</sub> )
Logan	48	39	0,8	2,7	3,9	-
	72	47	0,7	3,3	3,9	-
Hidrolizado	48	57	1,2	3,9	5,9	0,08
	72	101	1,4	7,0	8,0	0,14

**Tabla 12. Parámetros de producción de hidrógeno para las fermentaciones en biorreactor.** Se detallan los parámetros de concentración (mg H<sub>2</sub>/L cultivo), productividad volumétrica (mg H<sub>2</sub>/L h), productividad total (mg H<sub>2</sub>/h), rendimiento en función de los azúcares reductores consumidos (mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub>) y rendimiento en función de la cantidad de cáscara de arroz utilizada (mg H<sub>2</sub>/g<sub>sustrato</sub>), para las fermentaciones realizadas en biorreactor de tanque agitado con medio definido de Logan (control) y con 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado, a las 48 h y 72 h de proceso.

En la **Tabla 13** se detallan los valores de pH determinados durante ambas fermentaciones realizadas en biorreactor. En primer lugar, se observa que el pH tanto del medio definido de Logan como del hidrolizado detoxificado puro, ajustado en ambos casos a un valor de 6 antes de la inoculación, aumentó levemente al inicio de las fermentaciones, seguramente por el agregado del inóculo. Asimismo, a partir de las 24 h de fermentación se registró la acidificación de ambos cultivos hasta el final del proceso fermentativo. En particular, la fermentación realizada en medio de Logan alcanzó un menor valor de pH a las 72 h de proceso (pH: 4,3), en comparación con la fermentación en hidrolizado detoxificado puro al mismo tiempo (pH: 4,65). Es importante mencionar que, la disminución del pH durante el proceso de ambas fermentaciones confirma el metabolismo acidogénico, productor de hidrógeno, característico del consorcio microbiano utilizado.

Tiempo de fermentación (h)	Fermentaciones	
	Medio definido de Logan (Control)	Hidrolizado detoxificado de cáscara de arroz puro
0	6,12	6,37
24	4,66	4,99
48	4,46	4,75
72	4,3	4,65

**Tabla 13. Valores de pH durante las fermentaciones a escala biorreactor.** Valores de pH determinados con pHmetro a partir de muestras de las fermentaciones del consorcio bacteriano en biorreactor de tanque agitado con medio definido de Logan como control y con 100 % (v/v) de hidrolizado de cáscara de arroz detoxificado.

## 5. DISCUSIÓN

En el transcurso del presente trabajo de tesis de grado, se han llevado a cabo una serie de ensayos con el objetivo general de optimizar la producción de biohidrógeno mediante cultivos en frascos *Erlenmeyer* y fermentaciones en biorreactor bajo condiciones anaeróbicas con un consorcio microbiano proveniente de un biodigestor y utilizando hidrolizados lignocelulósicos como materia prima. En base a los resultados obtenidos, se procederá a analizar los aspectos pertinentes de los ensayos realizados y compararlos con la bibliografía existente.

A partir del ensayo de linealidad de la **Sección 4.1**, se verificó que los métodos colorimétricos evaluados para la cuantificación de nutrientes (glucosa, azúcares reductores y pentosas) e inhibidores (furfurales y fenoles) presentes en los hidrolizados lignocelulósicos, exhibieron adecuada linealidad ( $R^2$  mayor o igual a 0,995) en los rangos de trabajo ensayados. Estos resultados junto con los obtenidos a partir del análisis de las soluciones testigo, permitieron confirmar que dichos métodos analíticos son confiables para su utilización en la cuantificación de glucosa, azúcares reductores, pentosas y furfurales, y fenoles, presentes en los hidrolizados químicos lignocelulósicos. Esto es congruente con la bibliografía a partir de la cual se extrajo el protocolo de cada método citado en la **Sección 3.1**.

A su vez, a partir del análisis de aptitud de la **Sección 4.3** aplicado a 9 sustratos lignocelulósicos y considerando los criterios de: concentración de nutrientes e inhibidores de los hidrolizados lignocelulósicos, y disponibilidad, facilidad de almacenamiento y transporte de los sustratos, se determinó que la cáscara de arroz se presenta como el sustrato lignocelulósico más adecuado para la obtención de hidrolizados químicos lignocelulósicos, para su utilización como medio de cultivo en la producción de biohidrógeno mediante el proceso de fermentación oscura con el consorcio microbiano proveniente de un biodigestor. Así, las principales ventajas que presenta la cáscara de arroz para tal fin son las concentraciones óptimas de glucosa (8,5 g/L) y pentosas (25 g/L) presentes en los hidrolizados lignocelulósicos obtenidos a partir de este sustrato, que favorecen la producción de hidrógeno mediante el metabolismo acidogénico. Asimismo, la cáscara de arroz presenta como ventajas su bajo costo de almacenamiento y transporte, y que no posee otra factible aplicación que podría competir con su utilización como materia prima para la producción de biohidrógeno. En cuanto a la eficiencia del procedimiento de hidrólisis ácida, los porcentajes de conversión de celulosa (5 %) y hemicelulosa (20 %) de la cáscara de arroz, resultaron significativamente superiores a los valores obtenidos mediante la hidrólisis con ácido sulfúrico 1,47 % (p/p) implementada por Germec *et al.* (2016), los cuales fueron 2 % y 8 %, respectivamente. Por otro lado, en el trabajo de Lau *et al.* (2015) se ha reportado un porcentaje de conversión de celulosa para la cáscara de arroz de 41 % utilizando ácido sulfúrico 72 % (p/p), la cual es una concentración de ácido notoriamente mayor a la empleada en este trabajo de Tesis (9,8 % p/p), y a la utilizada por Germec *et al.* (2016).

Cabe indicar que, según un modelo desarrollado por Kang *et al.* (2014) para la evaluación de costos de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, el diseño de la cadena de suministros desempeña un papel crucial en la determinación de la viabilidad comercial de la producción de dicho biocombustible. Este modelo enfatiza la necesidad de llevar a cabo evaluaciones específicas para determinar la disponibilidad y el precio de la materia prima utilizada para la producción de biocombustibles. En consecuencia, resulta de vital importancia aplicar este tipo de análisis para evaluar las características de la materia prima de los biocombustibles, incluyendo aspectos como su disponibilidad, almacenamiento y transporte, en un contexto local. Este enfoque también es aplicable al proceso de producción de biohidrógeno a partir de biomasa lignocelulósica. Justamente, en este sentido, el análisis de aptitud aplicado a los distintos sustratos lignocelulósicos evaluados en este trabajo de tesis fue de gran importancia para evaluar las características de los sustratos y seleccionar al más adecuado como materia prima para la producción de biohidrógeno. En particular, Abbas y Ansumali (2010), han destacado que, la cáscara de arroz resulta de gran interés como materia prima para los procesos de producción de biocombustibles debido a su abundancia. Además, Ugheoke (2012) comparó el impacto ambiental y el rendimiento energético de la utilización de cáscara de arroz en la producción de biohidrógeno y concluyó que la fermentación oscura, proceso empleado en este trabajo de tesis, presenta el menor impacto ambiental y la mayor eficiencia en la conversión de energía, utilizando dicho sustrato como materia prima del proceso de producción de hidrógeno.

Asimismo, a partir de los resultados de la **Sección 4.4**, se determinó que, en los cultivos realizados con el consorcio microbiano proveniente de un biodigestor, se dificulta la cuantificación de la biomasa bacteriana por medio de la medición de densidad óptica, debido a la presencia de materia orgánica que interfiere con las cuantificaciones de la absorbancia mediante espectrofotometría. En este sentido, cuando la materia orgánica aportada por el consorcio microbiano se diluyó por acción de los repiques sucesivos realizados con medio definido de Logan, se consiguió una correlación entre la densidad óptica y la biomasa bacteriana de los cultivos. Así, los pasajes sucesivos realizados a partir del consorcio microbiano en medio definido permitieron eliminar la materia orgánica aportada por este consorcio. Sin embargo, dichos repiques sucesivos serían la causa de que el consorcio microbiano pierda la capacidad de producir hidrógeno, a pesar de consumir glucosa y generar gas, tal como se observa en las **Figuras 26 A y B** de la **Sección 4.5**. Esta pérdida de la capacidad para producir hidrógeno podría estar causada por la posible eliminación, a lo largo de los repiques sucesivos, de ciertas cepas bacterianas del consorcio fundamentales en el proceso de producción de hidrógeno mediante fermentación oscura. Este efecto, en los trabajos de Wang *et al.* (2010) y Diaz-Garcia *et al.* (2021), donde se realizó la dilución de un consorcio microbiano productor de hidrógeno aislado de rumen animal, se ha reportado la pérdida de la capacidad de dicho consorcio para producir hidrógeno. En este sentido, se propone evaluar a futuro la producción de hidrógeno a partir de cada repique sucesivo del

consorcio microbiano, con el propósito de detectar en qué repique se pierde la capacidad por parte del consorcio de producir el hidrógeno. A su vez, cabe destacar que a partir de los cultivos realizados con el consorcio microbiano original en medio definido de Logan (**Sección 4.5**), se consiguió la producción de hidrógeno mediante fermentación anaeróbica. Por estos motivos, en los ensayos posteriores se evaluó la producción de biohidrógeno a partir de hidrolizados lignocelulósicos de cáscara de arroz, utilizando el consorcio microbiano original y no el obtenido a partir de repiques sucesivos, a pesar de que aporten materia orgánica a los cultivos.

En la **Sección 4.6**, a partir de cultivos realizados en medio definido de Logan se determinó que el consorcio microbiano es capaz de utilizar tanto glucosa como xilosa como fuentes de carbono, siendo este resultado congruente con los estudios realizados por Reaume S. (2009) y Prakasham *et al.* (2009). A partir de los resultados de los cultivos en medio definido de Logan se podría concluir que el consorcio microbiano utilizado en esta tesis presenta un consumo preferencial por la glucosa en comparación con la xilosa. Esta conclusión se fundamenta en dos observaciones: en primer lugar, se evidenció que la velocidad volumétrica de consumo de glucosa superó a la de xilosa, tanto en los cultivos con la mezcla equitativa de estos azúcares (0,12 g/Lh vs 0,02 g/Lh), como en los cultivos con una de estas fuentes de carbono (0,11 g/Lh vs 0,09 g/Lh), siendo más marcada esta diferencia de velocidades en los cultivos con ambos azúcares. En segundo lugar, se observó que la acidificación de los cultivos fue más acentuada en condiciones de mayor concentración de glucosa, es decir en los cultivos con glucosa como única fuente de carbono, lo que sugiere una mayor actividad acidogénica en dichos cultivos, pudiéndose considerar a este resultado como indicativo de una mayor producción de hidrógeno. La primera de estas observaciones se desprende del análisis de las **Figuras 28 y 29**, las cuales muestran que, en los cultivos con la mezcla equitativa de azúcares, se registraron 3,4 g/L de xilosa remanente, es decir sin consumirse, a las 96 h de incubación, mientras que la glucosa se agotó por completo dentro de las 48 h de iniciado el cultivo. Por otro lado, cuando se empleó la glucosa como única fuente de carbono, esta se consumió casi en su totalidad, mientras que cuando se utilizó únicamente xilosa se registró un remanente de 3,5 g/L en el cultivo. Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos por Xu *et al.* (2010), quienes llevaron a cabo cultivos de una cepa perteneciente al género *Clostridium sp.* en un medio con glucosa y xilosa en relación equitativa (1:1), observando una disminución de la velocidad de consumo de xilosa en comparación con cultivos con xilosa como única fuente de carbono. Además, notaron que la velocidad de consumo de glucosa fue prácticamente similar en los cultivos con este azúcar como única fuente de carbono en comparación con los cultivos conteniendo la mezcla de azúcares. Con el propósito de completar la evaluación de la producción de hidrógeno a partir de distintas fuentes de carbono, se plantea realizar a futuro cultivos en medio definido con un azúcar o una mezcla de azúcares y efectuar la cuantificación del hidrógeno producido como parte integral del ensayo.

A partir de los ensayos de crecimiento del consorcio microbiano en frascos *Erlenmeyer* con hidrolizado de cáscara de arroz sin detoxificar (**Sección 4.7**), se observó consumo de azúcares reductores, en particular glucosa y pentosas, y se registró descenso del pH, en los cultivos realizados con 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar. En contraste, en los cultivos efectuados con concentraciones más elevadas de hidrolizado (50 %, 75 % y 100 % v/v), no se constató consumo de azúcares reductores, incluyendo glucosa y pentosas, por parte del consorcio microbiano, y se evidenció un incremento del pH de los cultivos. Una posible explicación para los resultados obtenidos a partir de los cultivos con elevadas concentraciones de hidrolizado (50 %, 75 % y 100 % v/v) sin detoxificar podría estar relacionada con la presencia en los cultivos de bacterias ácido-lácticas (BAL), las cuales pueden afectar negativamente la producción de H<sub>2</sub>. En este sentido, Monlau *et al.* (2014) y Cabrol *et al.* (2017) han indicado que los pretratamientos térmicos de los consorcios bacterianos, para ser utilizados como inóculos, no siempre son efectivos para prevenir el crecimiento de las BAL. En particular, en el trabajo de Monlau *et al.* (2014) se reportó que el género *Sporolactobacillus spp.* (género de BAL) puede alcanzar a ser dominante en cultivos realizados en hidrolizados lignocelulósicos, constituyendo cerca del 70 % de la comunidad bacteriana, a expensas del género *Clostridium spp.* Asimismo, los autores de este trabajo han sugerido que los subproductos resultantes de la hidrólisis ácida de los sustratos lignocelulósicos, como los furfurales, compuestos fenólicos, acetato y formiato, pueden ser los responsables de inducir un cambio en la composición de la comunidad bacteriana hacia las BAL y asimismo han indicado que la actividad de estas bacterias puede generar condiciones estresantes para las cepas de *Clostridium spp.*, lo que a su vez conduciría hacia un cambio en su metabolismo microbiano, favoreciendo la vía de solventogénesis. Asimismo, otras bacterias ácido-lácticas del género *Lactobacillus spp.* pueden disminuir la producción de H<sub>2</sub> al secretar bacteriocinas en los cultivos, lo que también puede generar condiciones estresantes para las células clostridiales y, como consecuencia, causar un cambio en su vía metabólica de producción de H<sub>2</sub> a la vía de producción de solventes como el etanol (Noike *et al.*, 2002). Del mismo modo, García *et al.* (2023), quienes llevaron a cabo procesos de fermentación oscura a partir de un consorcio microbiano similar al utilizado en este trabajo de tesis, han reportado que, al inicio de los procesos el género *Clostridium spp.* exhibió una abundancia relativa superior al 90 %, mientras que el género *Sporolactobacillus spp.* alcanzó valores cercanos al 20 % hacia el final de los mismos, lo que es congruente con lo indicado por Monlau *et al.* (2014). Dado que la vía de solventogénesis implica la conversión de ácidos en solventes (Zheng *et al.*, 2015), es posible que esta acción haya provocado el aumento del pH en los cultivos realizados con elevadas concentraciones de hidrolizado (50 %, 75 % y 100 % v/v) sin detoxificar, tal como se indicó en la **Tabla 8**. Sumado a lo previamente planteado, la posibilidad de que el consorcio microbiano haya cambiado del metabolismo acidogénico al solventogénico en los cultivos con elevadas concentraciones de hidrolizado sin detoxificar, podría ser la causa por la cual en estos cultivos no se registró consumo de azúcares reductores como su principal fuente de carbono (**Figura 31**), y en contrapartida el consorcio puede haber metabolizado

algún ácido orgánico, como ácido acético, presente frecuentemente en hidrolizados lignocelulósicos (Sivagurunathan *et al.*, 2017), generado en consecuencia solventes, como la acetona, sin la producción de biohidrógeno.

Dado que se presumió que los subproductos generados por la hidrólisis ácida de la cáscara de arroz, como los furfurales y compuestos fenólicos, podrían haber desencadenado el cambio metabólico en el consorcio bacteriano de los cultivos realizados con elevadas concentraciones de hidrolizado sin detoxificar, pasando de la vía de acidogénesis a la de solventogénesis, surgió la necesidad de evaluar la eficacia de una estrategia de detoxificación de los hidrolizados lignocelulósicos para reducir la concentración de estos compuestos inhibidores. El protocolo de detoxificación empleado, el cual se basó en el método descrito por Chang *et al.* (2011), se conformó por una primer etapa de sobrealcalinización (*overliming*) y un posterior tratamiento con carbón activado. Mediante este procedimiento de detoxificación se consiguió reducir de manera significativa las concentraciones de furfurales y fenoles en los hidrolizados de cáscara de arroz (**Sección 4.8**). Así, la concentración de furfurales disminuyó más de 85 % y la concentración de fenoles cerca de 60 % luego del proceso de detoxificación (**Tabla 9**), destacando que el tratamiento con carbón activado fue la etapa que mayor efecto de detoxificación presentó sobre estos compuestos tóxicos. Cabe destacar que, los niveles de azúcares reductores, glucosa y pentosas en el hidrolizado de cáscara de arroz no se vieron afectados significativamente por la detoxificación. En el trabajo de Chang *et al.* (2011), los furfurales fueron eliminados por completo mediante el tratamiento de detoxificación, y, al igual que en el presente trabajo de tesis, la concentración de azúcares reductores no se vio afectada significativamente por dicha metodología. Tal como se indicó, en este trabajo de tesis la concentración de furfurales disminuyó 85 % con la detoxificación, en comparación con una reducción de 100 % reportada por Chang *et al.* (2011). Una posible explicación para esta diferencia podría radicar en que el hidrolizado lignocelulósico empleado por Chang *et al.* (2011) previo al tratamiento de detoxificación contenía una concentración menor de furfurales (2,5 g/L), mientras que el hidrolizado utilizado en esta tesis contenía 4,1 g/L.

Así, mediante el tratamiento de detoxificación utilizado se consiguió obtener hidrolizados de cáscara de arroz con menor concentración de furfurales y fenoles, con los cuales se alcanzó el adecuado crecimiento del consorcio microbiano en frascos *Erlenmeyer* y la concomitante producción de biohidrógeno, aún mediante cultivos realizados con elevada concentración de hidrolizado (**Sección 4.9**). Es decir que, se logró la producción de biohidrógeno a partir de cultivos anaeróbicos no solo realizados con 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar, sino también con 50 %, 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado. Cabe remarcar que, previamente no se había conseguido un metabolismo acidogénico productor de hidrógeno con dichas concentraciones de hidrolizado de cáscara de arroz, debido a que estos habían sido utilizados sin detoxificar. En definitiva, es importante resaltar que la detoxificación de los hidrolizados de cáscara de arroz se presenta como un procedimiento indispensable a realizar para concretar la producción de biohidrógeno a partir de

hidrolizados con concentraciones mayores al 25 % (v/v). Así, mediante los cultivos anaeróbicos realizados en frascos *Erlenmeyer* con 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado se alcanzaron valores mayores de concentración de hidrógeno (32 - 33 mg H<sub>2</sub>/L cultivo), productividad volumétrica de H<sub>2</sub> a tiempo final del proceso (0,44 - 0,46 mg H<sub>2</sub>/L h), productividad total de H<sub>2</sub> (0,11 mg H<sub>2</sub>/h) y rendimiento de hidrógeno respecto a los azúcares reductores consumidos (2,58 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub>), en comparación con los cultivos realizados en 25 % y 50 % (v/v) de hidrolizado y respecto a los cultivos en medio definido de Logan (control). De este modo, es importante destacar que, la productividad volumétrica y total de hidrógeno para los cultivos en 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado fue 11 veces superior en comparación con los cultivos en 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar y en medio definido de Logan (control), mientras que el rendimiento de hidrógeno por gramo de azúcar reductor para los cultivos en 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado fue 8 veces mayor respecto a los cultivos en 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar y al control. Cabe indicar que, a partir de los cultivos realizados en 25 % (v/v) de hidrolizado sin detoxificar, se consiguió el crecimiento del consorcio y la producción de hidrógeno, lo cual concuerda con resultados previos de crecimiento del consorcio de la **Sección 4.7**. El rendimiento de H<sub>2</sub> en base al consumo de azúcares reductores y la productividad volumétrica de H<sub>2</sub> a tiempo final, para los cultivos en frascos *Erlenmeyer* con medio definido de Logan (control) fueron 0,32 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub> y 0,04 mg H<sub>2</sub>/L h, respectivamente. En la **Tabla 14** se presenta una recopilación bibliográfica correspondiente a la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura, a partir de cultivos con volúmenes iguales o menores a 500 ml, en los cuales se utilizó glucosa o sustratos lignocelulósicos como materia prima.

Sustrato	Inóculo	Rendimiento	Productividad Volumétrica	Volumen Final	Bibliografía
Glucosa	Consorcio bacteriano de biodigestor)	16,21 mg H <sub>2</sub> /g <sub>az. red.</sub>	20,02 mg H <sub>2</sub> /L h	80 ml	Davila-Vazquez <i>et al.</i> (2008)
Glucosa	Consorcio bacteriano de compost	11,10 mg H <sub>2</sub> /g <sub>az. red.</sub>	5,23 mg H <sub>2</sub> /L h <sup>a</sup>	500 ml	Morimoto (2004)
Cáscara de arroz	Consorcio bacteriano de biodigestor	0,24 mg H <sub>2</sub> /g sustrato	1,33 mg H <sub>2</sub> /L h	60 ml	Lay <i>et al.</i> (2020)
Cáscara de arroz	Consorcio bacteriano de biodigestor	26,19 mg H <sub>2</sub> /g sustrato <sup>a</sup>	8,88 mg H <sub>2</sub> /L h <sup>a</sup>	40 ml	Gonzales & Kim (2017)
Cáscara de maní	<i>Clostridium guangxiense</i>	0,52 mg H <sub>2</sub> /g sustrato <sup>a</sup>	-	50 ml	Qi <i>et al.</i> (2018)
Residuos de castañas de cajú	<i>Clostridium roseum</i>	0,15 mg H <sub>2</sub> /g sustrato <sup>a</sup>	1,03 mg H <sub>2</sub> /L h <sup>a</sup>	250 ml	Silva <i>et al.</i> (2018)
Rastrojo de sorgo dulce	Consorcio bacteriano de biodigestor	-	3,91 mg H <sub>2</sub> /L h <sup>a</sup>	100 ml	Shanmugam <i>et al.</i> (2018)

**Tabla 14. Recopilación bibliográfica correspondiente a la producción de hidrógeno mediante cultivos con volúmenes iguales o menores a 500 ml.** Para cada proceso se detalla el sustrato empleado, tipo de inóculo utilizado, rendimiento de hidrógeno, productividad volumétrica de hidrógeno, volumen final de cultivo y la respectiva referencia bibliográfica. <sup>a</sup>: condiciones estándar de presión y temperatura (1 atm, 25°C) asumidas en los cálculos.

Así, en la **Tabla 14** se indican los rendimientos de hidrógeno reportados por Davila-Vazquez *et al.* (2008) y Morimoto (2004), con valores de 16,21 y 11,10 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub>, respectivamente, los cuales se ubican dentro del rango promedio para los procesos de fermentación oscura, desde 11,1 a 22,2 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub> según Cheng *et al.* (2011). Asimismo, Davila-Vazquez *et al.* (2008) y Morimoto (2004) reportaron valores máximos de productividad volumétrica de hidrógeno de 20,02 y 5,23 mg H<sub>2</sub>/Lh, respectivamente, para sus correspondientes procesos de producción de H<sub>2</sub> realizados en medio definido con glucosa como fuente de carbono y con consorcios bacterianos anaerobios como inóculos. Es importante destacar que, estos valores de productividad volumétrica son los valores máximos alcanzados durante el proceso fermentativo, mientras que al final del proceso la productividad volumétrica generalmente presenta valores menores. En este sentido, la productividad volumétrica al final del proceso de Davila-Vazquez *et al.* (2008) fue 2,14 mg H<sub>2</sub>/Lh, lo que refleja una marcada disminución con respecto al valor máximo alcanzado.

Para el caso de procesos de producción de hidrógeno realizados a partir de cáscara de arroz, se han reportado valores de rendimiento de H<sub>2</sub> en base al sustrato y productividad volumétrica de H<sub>2</sub> que varían significativamente según los trabajos. En este sentido, Lay *et al.* (2020), alcanzaron un rendimiento de 0,24 mg H<sub>2</sub>/g sustrato y una productividad volumétrica de 1,33 mg H<sub>2</sub>/L h, mientras que Gonzales & Kim (2017) consiguieron un rendimiento de 26,19 mg H<sub>2</sub>/g sustrato y una productividad de 8,88 mg H<sub>2</sub>/L h, utilizando en ambos casos como inóculo un consorcio bacteriano anaeróbico proveniente de un biodigestor (**Tabla 14**). Cabe mencionar que, en el trabajo de Lay *et al.* (2020) no se aplicó ningún tipo de pretratamiento a la cáscara de arroz, a diferencia de Gonzales & Kim (2017), que aplicaron un pretratamiento de hidrólisis ácida y enzimática al sustrato lignocelulósico. Además, Gonzales & Kim (2017) suplementaron el hidrolizado lignocelulósico con sales y realizaron el cultivo anaeróbico en botellas aplicando una agitación de 150 rpm, y una purga previa con N<sub>2</sub> gaseoso para desplazar el O<sub>2</sub> disuelto del medio. Estas diferencias pueden haber contribuido de manera significativa al mayor rendimiento y productividad de hidrógeno obtenido por Gonzales & Kim (2017).

En el presente trabajo de tesis, el valor más elevado alcanzado para el rendimiento de hidrógeno por gramo de azúcar reductor fue 2,58 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub>, obtenido mediante cultivos del consorcio bacteriano en frascos *Erlenmeyer* con 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado de cáscara de arroz detoxificado. En el caso del hidrolizado puro (100 % v/v), dicho valor de rendimiento en base a los azúcares reductores consumidos equivale a 0,05 mg H<sub>2</sub>/g sustrato. Respecto a la productividad volumétrica de H<sub>2</sub>, en este trabajo se obtuvieron valores a tiempo final de 0,44 y 0,46 mg H<sub>2</sub>/Lh a partir de los cultivos en frascos *Erlenmeyer* con 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado, respectivamente. Estos resultados contrastan con los informados por Lay *et al.* (2020) y Gonzales & Kim (2017), quienes obtuvieron valores de rendimiento y productividad volumétrica más elevados, tal como se mencionó.

Los bajos valores de rendimiento de hidrógeno obtenidos mediante los cultivos en frascos *Erlenmeyer* tanto con medio definido de Logan como con los hidrolizados detoxificados de cáscara de arroz, en comparación con el rango promedio (11,1 a 22,2 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub>) indicado en Cheng *et al.* (2011) y respecto al valor reportado por Gonzales & Kim (2017), podrían atribuirse a una reducida actividad del consorcio bacteriano proveniente del biodigestor, el cual fue utilizado como inóculo de los cultivos. En los consorcios microbianos, la disminución en la actividad bacteriana puede deberse tanto a la muerte celular, que implica una reducción en la cantidad de bacterias activas, como a una disminución en la actividad metabólica de las bacterias activas, es decir, una reducción en su actividad específica. Esto puede ocurrir en condiciones donde no hay suficientes sustratos disponibles, ya que las bacterias poseen la capacidad de ajustar sus procesos metabólicos y disminuir sus requerimientos de energía para su propio mantenimiento (Hao *et al.*, 2009). En el contexto de este trabajo de tesis, la disminución de la actividad bacteriana del consorcio utilizado como inóculo podría haber sido causada por un prolongado tiempo de almacenamiento del mismo, en el cual el consorcio bacteriano podría haber experimentado condiciones de escasez de nutrientes, tal como ha reportado Lopez *et al.* (2006).

Por tal motivo, con el propósito de aumentar el rendimiento de biohidrógeno mediante cultivos anaeróbicos en hidrolizados de cáscara de arroz, se podría considerar llevar a cabo la inoculación utilizando un cultivo del consorcio bacteriano realizado previamente en un medio adecuado, tal como han efectuado Yang & Wang (2018), para incrementar así la carga microbiana y su actividad durante el proceso fermentativo. Además, se podría considerar la suplementación de los hidrolizados lignocelulósicos con sales minerales para conseguir un mayor crecimiento del cultivo y aumentar por ende la producción de hidrógeno, tal como ha indicado Gonzales & Kim (2017).

Dado que a partir de los cultivos realizados con 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado de cáscara de arroz se alcanzaron los valores más elevados de rendimiento y productividad de hidrógeno a escala *Erlenmeyer*, se decidió seleccionar al hidrolizado detoxificado puro (100 % v/v) para realizar el escalado de la producción de hidrógeno mediante fermentaciones del consorcio bacteriano en biorreactor de tanque agitado de escala laboratorio (**Sección 4.10**). Esta elección se efectuó con el objetivo de reemplazar totalmente al medio definido de Logan por hidrolizado lignocelulósico para disminuir de este modo los costos del proceso de producción del biohidrógeno. Así, mediante la fermentación realizada en biorreactor con hidrolizado detoxificado puro se consiguió un mayor porcentaje de H<sub>2</sub> en el biogás en comparación con la fermentación control en medio de Logan (29 % vs 16 %), siendo por ende mayor el volumen de hidrógeno obtenido con el hidrolizado puro al final de proceso (72 h), respecto a la fermentación control (6,2 L vs 2,9 L) (**Figura 48**). De esta manera, mediante la fermentación realizada en 100 % de hidrolizado detoxificado se alcanzaron valores más elevados para los parámetros de producción de hidrógeno en comparación con el control: productividad volumétrica de H<sub>2</sub> al final del proceso (1,4 mg H<sub>2</sub>/L h vs 0,7 mg H<sub>2</sub>/L h), productividad

total de H<sub>2</sub> (7,0 mg H<sub>2</sub>/h vs 3,3 mg H<sub>2</sub>/h) y rendimiento de hidrógeno respecto a los azúcares reductores consumidos (8,0 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub> vs 3,9 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub>). Asimismo, cabe destacar que, mediante la fermentación en biorreactor con 100 % hidrolizado detoxificado se alcanzaron valores de productividad volumétrica H<sub>2</sub>, rendimiento de H<sub>2</sub> por gramo de azúcar reductor y rendimiento de H<sub>2</sub> por gramo de sustrato, 3 veces superiores a los obtenidos mediante cultivos en frascos *Erlenmeyer* con el mismo hidrolizado. Mientras que, la productividad total de H<sub>2</sub> alcanzada a partir de la fermentación en biorreactor con 100 % de hidrolizado fue 64 veces superior respecto a los cultivos en frascos *Erlenmeyer* con dicho hidrolizado. Este análisis comparativo indica que se consiguió un adecuado escalado de la producción de hidrógeno mediante fermentación en biorreactor con 100 % de hidrolizado detoxificado de cáscara de arroz. Cabe indicar que, mediante la fermentación realizada con medio de Logan también se consiguieron parámetros de producción de H<sub>2</sub> más elevados respecto a los cultivos en frascos *Erlenmeyer* con dicho medio, lo cual confirma que las condiciones utilizadas para efectuar el escalado del proceso fueron adecuadas.

En la **Tabla 15** se presenta una recopilación bibliográfica de procesos de fermentación oscura realizados en biorreactores de escala laboratorio y semi-piloto, con volúmenes finales de cultivo de 2 a 50 L. El resultado de rendimiento de H<sub>2</sub> respecto a los azúcares reductores consumidos, obtenido en esta tesis mediante fermentación en biorreactor con medio definido de Logan (3,9 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub>) es especialmente comparable con los valores reportados por Si *et al.* (2015) y Lin & Chang (1999) (**Tabla 15**), quienes obtuvieron rendimientos de 7,44 y 7,10 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub>, respectivamente, utilizando glucosa como fuente de carbono y como inóculo el mismo tipo de consorcio bacteriano utilizado en esta tesis. Por otra parte, la productividad volumétrica de H<sub>2</sub> a tiempo final (72 h) obtenida en este trabajo de tesis mediante fermentación en biorreactor con medio de Logan (0,7 mg H<sub>2</sub>/L h), es comparable con la productividad volumétrica final obtenida por Mizuno *et al.* (2000) luego de 42,5 h de proceso (1,57 mg H<sub>2</sub>/L h); sin embargo, Si *et al.* (2015) y Lin & Chang (1999) obtuvieron productividades volumétricas más elevadas (4,36 y 2,78 mg H<sub>2</sub>/Lh, respectivamente) (**Tabla 15**).

Por otra parte, Sattar *et al.* (2016) llevaron a cabo la producción de hidrógeno mediante el proceso de fermentación oscura en biorreactor de escala laboratorio a partir de cáscara de arroz sin hidrolizar, obteniendo un rendimiento y productividad volumétrica de H<sub>2</sub> de 22,5 ml/VS y 6,0 ml/día VS, respectivamente, pero lamentablemente estas unidades no son convertibles a las que se utilizaron en esta tesis, por lo cual no es factible realizar una correcta comparación con dicho trabajo de Sattar *et al.* (2016) (**Tabla 15**). En este sentido, la falta de uniformidad en las unidades de ciertos parámetros de producción es común en este campo de estudio, en donde diversos trabajos no proporcionan suficiente información para convertir el valor de un parámetro con una determinada unidad a otra, por lo que se dificulta la comparación de resultados (Soares *et al.* 2020).

No obstante, al comparar los resultados de esta tesis con los trabajos a pequeña escala de la **Tabla 14**, se observa que el rendimiento de hidrógeno por gramo de sustrato obtenido mediante fermentación en biorreactor con 100 % de hidrolizado detoxificado (0,14 mg H<sub>2</sub>/g sustrato) es comparable con los valores informados por Lay *et al.* (2020) y Qi *et al.* (2018), de 0,24 y 0,52 mg H<sub>2</sub>/g sustrato, respectivamente, quienes también utilizaron cáscara de arroz como sustrato para producir hidrógeno pero a pequeña escala (**Tabla 14**). Por otra parte, la productividad volumétrica obtenida en esta tesis mediante la fermentación en biorreactor con 100 % de hidrolizado detoxificado (1,4 mg H<sub>2</sub>/Lh), resultó superior a las reportadas por Lay *et al.* (2020) y Silva *et al.* (2018) de 1,33 y 1,03 mg H<sub>2</sub>/Lh, respectivamente, quienes también utilizaron hidrolizados lignocelulósicos para los cultivos (**Tabla 14**).

Además, el rendimiento de hidrógeno por gramo de azúcar reductor obtenido a partir de la fermentación en biorreactor con 100 % de hidrolizado detoxificado (8 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub>), resultó similar a los valores reportados por Si *et al.* (2015), Mizuno *et al.* (2000) y Lin & Chang (1999), de 7,44, 9,44 y 7,10 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub>, respectivamente, (**Tabla 15**), quienes utilizaron glucosa como fuente de carbono y como inóculo un consorcio bacteriano similar al utilizado en esta tesis

Sustrato	Inóculo	Rendimiento	Productividad volumétrica	Volumen Final	Bibliografía
Glucosa	Consortio anaeróbico de biodigestor	7,44 mg H <sub>2</sub> /g <sub>az. red.</sub>	4,36 mg H <sub>2</sub> /L h <sup>a</sup>	2,5 L	Si <i>et al.</i> (2015)
Glucosa	Consortio anaeróbico de soja fermentada	9,44 mg H <sub>2</sub> /g <sub>az. red.</sub>	1,57 mg H <sub>2</sub> /L h <sup>a</sup>	2,3 L	Mizuno <i>et al.</i> (2000)
Glucosa	Consortio anaeróbico de biodigestor	7,10 mg H <sub>2</sub> /g <sub>az. red.</sub>	2,78 mg H <sub>2</sub> /L h	4 L	Lin & Chang (1999)
Cáscara de arroz	Consortio anaeróbico de biodigestor	22,5 ml/VS	6,0 ml/día VS	20 L	Sattar <i>et al.</i> (2016)
Residuos industriales de café	Consortio anaeróbico de biodigestor	1,78 mg H <sub>2</sub> /g <sub>az. red.</sub>	5,72 mg H <sub>2</sub> /L h <sup>a</sup>	5 L	Jung <i>et al.</i> (2010)
Hojas de sorgo	Consortio anaeróbico de biodigestor	17,41 mg H <sub>2</sub> /g <sub>az. red.</sub>	0,24 mg H <sub>2</sub> /L h <sup>a</sup>	13 L	Rorke & Gueguim Kana (2016)
Melaza de caña	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	11,02 mg H <sub>2</sub> /L h <sup>a</sup>	50 L	Balachandar <i>et al.</i> (2020)
Residuos de destilación de arroz	Consortio anaeróbico de biodigestor	23,76 mg H <sub>2</sub> /g <sub>az. red.</sub>	12,97 mg H <sub>2</sub> /Lh <sup>a</sup>	2,9 L	Yu (2002)

**Tabla 15. Comparación bibliográfica de procesos de fermentación oscura realizados en biorreactores a escala laboratorio y semi-piloto.** Para cada proceso se indica el sustrato empleado, tipo de inóculo utilizado, rendimiento de hidrógeno, productividad volumétrica de hidrógeno, volumen final de cultivo y las respectivas referencias bibliográficas. <sup>a</sup>: condiciones estándar de presión y temperatura (1 atm, 25°C) asumidas en los cálculos. VS: unidad de medida de sólidos volátiles totales.

Asimismo, la fermentación en biorreactor realizada en este trabajo de tesis con 100 % de hidrolizado detoxificado, se puede comparar con otros procesos de producción de hidrógeno que también emplearon sustratos lignocelulósicos como materia prima y consorcios bacterianos provenientes de biodigestores como inóculo. En este sentido, Jung *et al.* (2010) obtuvo un rendimiento de hidrógeno de 1,78 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub>, utilizando residuos industriales de café como sustrato, mientras que Rorke & Gueguim Kana (2016), obtuvieron un rendimiento de 17,41 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub> a partir de hojas de sorgo (**Tabla 15**), es decir un valor marcadamente menor y otro mayor respecto al obtenido en esta tesis (8 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub>). Por otro lado, Yu (2002), ha reportado un rendimiento de H<sub>2</sub> de 23,76 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub> al utilizar residuos de una industria destiladora de arroz en China, siendo este valor el más elevado comparativamente con el resto de los trabajos de la **Tabla 15** y respecto a esta tesis; esta diferencia podría deberse a que dicho tipo de residuo de arroz es rico en azúcares fermentables, tal como ha indicado Yu (2002).

Cabe destacar también que, Kumar *et al.* (2001) han reportado un elevado rendimiento de hidrógeno en base al consumo de azúcares reductores de 42,19 mg H<sub>2</sub>/g<sub>azúcar reductor</sub>, mediante fermentación en biorreactor utilizando medio definido con glucosa como fuente de carbono y como inóculo un cultivo axénico de *Enterobacter cloacae*, en condiciones de baja presión parcial de hidrógeno. Es relevante resaltar que, según Cao *et al.* (2022) la reducida presión parcial de hidrógeno podría haber influido positivamente en el elevado rendimiento alcanzado mediante dicho proceso.

Asimismo, cabe remarcar que la productividad volumétrica de H<sub>2</sub> obtenida en este trabajo de tesis mediante fermentación en biorreactor al final del proceso (1,4 mg H<sub>2</sub>/Lh) resultó ser mayor que el valor informado por Rorke & Gueguim Kana (2016) de 0,24 mg H<sub>2</sub>/Lh luego de 84 h de fermentación, aunque menor a los valores reportados por Jung *et al.* (2010) de 5,72 mg H<sub>2</sub>/Lh a las 72 h y por Balachandar *et al.* (2020) de 11,02 mg H<sub>2</sub>/Lh luego de 21,5 h de proceso, utilizando melaza de caña como materia prima. A su vez, Yu (2002) obtuvo una productividad volumétrica máxima de 12,97 mg H<sub>2</sub>/Lh, a partir de residuos de la industria destiladora de arroz (**Tabla 15**). Tal como se indicó, existe una gran variabilidad entre los trabajos respecto a los valores de rendimiento y productividad de hidrógeno reportados, la cual depende principalmente de los sustratos o materia prima utilizada y de las condiciones del proceso.

Por último, es importante destacar también que durante la fermentación en biorreactor utilizando hidrolizado detoxificado puro, no se registró una variación significativa en la concentración de furfurales. Esta observación contrasta con los resultados obtenidos a partir de los cultivos realizados en frascos *Erlenmeyer* con el mismo hidrolizado detoxificado puro, donde se observó una disminución en la concentración de furfurales. Además, existió una diferencia en el consumo de pentosas del hidrolizado entre la fermentación en biorreactor y los cultivos en frascos *Erlenmeyer*, con un mayor consumo en el biorreactor (6,5 g/L) en comparación con los cultivos en *Erlenmeyer* (4 g/L), aunque en ambos casos la glucosa fue consumida en su totalidad. Estas diferencias entre ambas escalas de producción, es decir, cultivos en frascos

*Erlenmeyer* y fermentaciones en biorreactor, podrían estar causadas por las condiciones operativas de cada estrategia, en particular por el efecto generado por la agitación (50 RPM) durante las fermentaciones en biorreactor, que podría haber favorecido la disponibilidad de azúcares reductores, incluyendo las pentosas, para el consorcio microbiano y, por ende, haber incrementado el consumo de estos. Asimismo, el efecto de la agitación en el biorreactor podría haber evitado la necesidad para el consorcio microbiano de cambiar su metabolismo para poder utilizar una fuente de carbono alternativa, como los furfurales. En definitiva, se puede afirmar que las condiciones aplicadas durante las fermentaciones del consorcio bacteriano en biorreactor de tanque agitado no solo permiten un mayor consumo de azúcares durante el proceso fermentativo, sino que también favorecen la producción de hidrógeno, aumentando así su rendimiento y productividad. En este sentido, cabe destacar que la purga del O<sub>2</sub> disuelto en el medio aplicando un flujo de N<sub>2</sub> gaseoso antes de iniciar la fermentación en biorreactor, se presenta como otro factor importante dentro de las condiciones aplicadas en esta escala, además de la mencionada agitación, que permiten incrementar el rendimiento y la productividad del biohidrógeno, en pos de conseguir un adecuado escalado del proceso de producción.

## 6. CONCLUSIONES

- **Evaluación de métodos analíticos:** Los métodos colorimétricos utilizados para cuantificar azúcares reductores, glucosa y pentosas, como así también furfurales y fenoles, presentes en los hidrolizados químicos lignocelulósicos demostraron ser lineales y confiables en los rangos de trabajo evaluados.
- **Selección del sustrato lignocelulósico:** Se identificó a la cáscara de arroz como el sustrato lignocelulósico más adecuado para la obtención de hidrolizados químicos lignocelulósicos, debido a que estos presentaron una óptima concentración de glucosa y pentosas, tal de favorecer la producción de hidrógeno mediante fermentación oscura. Además, la cáscara de arroz presenta como ventaja su reducido costo de almacenamiento y transporte, y que no posee otra aplicación que podría competir con su uso en este proceso de producción.
- **Efectos de los repiques sucesivos:** Si bien los repiques sucesivos del consorcio microbiano permiten eliminar la materia orgánica presente en este, se observó que pueden conducir a la pérdida de su capacidad para producir hidrógeno, posiblemente debido a la eliminación de cepas bacterianas indispensables para el proceso. Se sugiere evaluar la producción de hidrógeno en cada iteración de repique del consorcio para evitar esta pérdida.
- **Uso de glucosa y xilosa como fuentes de carbono del consorcio:** Se determinó que el consorcio bacteriano proveniente del biodigestor de materia orgánica presenta la capacidad de utilizar tanto glucosa como xilosa como fuentes de carbono, aunque con mayor preferencia por la glucosa.
- **Detoxificación del hidrolizado de cáscara de arroz:** La detoxificación del hidrolizado químico de cáscara de arroz mediante la sobrealcalinización y tratamiento con carbón activado, resultó efectiva para reducir la concentración de compuestos tóxicos o inhibidores microbianos, como furfurales y fenoles, lo cual remarca la importancia de aplicar dicho procedimiento al hidrolizado de cáscara de arroz para conseguir la producción de biohidrógeno a partir de este.
- **Producción de biohidrógeno a escala Erlenmeyer:** Mediante cultivos del consorcio bacteriano en frascos *Erlenmeyer* con hidrolizado de cáscara de arroz se determinó la necesidad de utilizar hidrolizados detoxificados con elevada concentración (75 % y 100 % v/v), para alcanzar así rendimientos y productividades de hidrógeno mayores a los conseguidos con medio definido de Logan. Se destaca la importancia de mejorar la viabilidad del inóculo, y considerar la

preparación de pre-inóculos y la suplementación de los hidrolizados con sales minerales para conseguir mayor producción de H<sub>2</sub>.

- **Producción de biohidrógeno a escala biorreactor de laboratorio:** Mediante fermentación del consorcio bacteriano en biorreactor de tanque agitado con hidrolizado detoxificado de cáscara de arroz puro, se alcanzaron valores de rendimiento y productividad de hidrógeno más elevados que los obtenidos con los cultivos en frascos *Erlenmeyer*. Las condiciones aplicadas durante el proceso de fermentación en biorreactor permitieron aumentar el consumo de azúcares y la producción de hidrógeno. Los valores de rendimiento y productividad de hidrógeno conseguidos mediante fermentación con hidrolizado detoxificado de cáscara de arroz puro fueron cercanos a los valores promedio reportados en bibliografía.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., & Ansumali, S. (2010). Global Potential of Rice Husk as a Renewable Feedstock for Ethanol Biofuel Production. *BioEnergy Research*, 3(4), 328-334.
- Abdalla, A. M., Hossain, S., Nisfindy, O. B., Azad, A. T., Dawood, M., & Azad, A. K. (2018). Hydrogen production, storage, transportation and key challenges with applications: A review. *Energy Conversion and Management*, 165, 602-627.
- Abo, B., Gao, M., Wang, Y., Wu, C., Wang, Q., & Ma, H. (2019). Production of butanol from biomass: Recent advances and future prospects. *Environmental Science and Pollution Research*, 26.
- Academy of Sciences Malaysia. (2022, julio 27). *Position Paper on Hydrogen Economy by Academy of Sciences Malaysia—Issuu*.
- Akobi, C., Hafez, H., & Nakhla, G. (2016). The impact of furfural concentrations and substrate-to-biomass ratios on biological hydrogen production from synthetic lignocellulosic hydrolysate using mesophilic anaerobic digester sludge. *Bioresource Technology*, 221, 598-606.
- Androga, D. D., Özgür, E., Eroglu, I., Gündüz, U., Yücel, M., Androga, D. D., Özgür, E., Eroglu, I., Gündüz, U., & Yücel, M. (2012). Photofermentative Hydrogen Production in Outdoor Conditions. En *Hydrogen Energy—Challenges and Perspectives*. IntechOpen.
- Anwar, Z., Gulfraz, M., & Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 163-173.
- Area, M. C. (2019). *FIBRAS. ESTRUCTURA Y TOPOQUÍMICA*.
- Arminda, M., Josúe, C., Cristina, D., Fabiana, S., & Yolanda, M. (2021). Use of activated carbons for detoxification of a lignocellulosic hydrolysate: Statistical optimisation. *Journal of Environmental Management*, 296, 113320.
- Avella, L., Fernández, E., & Vázquez, C. J. (2001). Analysis of manufacturing strategy as an explanatory factor of competitiveness in the large Spanish industrial firm. *International Journal of Production Economics*, 72(2), 139-157.
- Baigorria T. (2019). *Bagazo de cerveza: Un subproducto con múltiples aplicaciones*. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.
- Bajpai, P. (2016). Structure of Lignocellulosic Biomass. En P. Bajpai (Ed.), *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production* (pp. 7-12). Springer.
- Baker, R. & Zhang, J. (2011). *PROTON EXCHANGE MEMBRANE or POLYMER ELECTROLYTE MEMBRANE (PEM) FUEL CELLS*.
- Balachandar, G., Varanasi, J. L., Singh, V., Singh, H., & Das, D. (2020). Biological hydrogen production via dark fermentation: A holistic approach from lab-scale to pilot-scale. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(8), 5202-5215.
- Ballesteros, M. (2010). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. En *Bioalcohol Production* (pp. 159-177). Elsevier.
- Bartlett, J., & Krupnick, A. (2020). *Decarbonized Hydrogen in the US Power and Industrial Sectors: Identifying and Incentivizing Opportunities to Lower Emissions*.
- Blainski, A., Lopes, G. C., & De Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852.
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B., & Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Enzyme Research*, 2011, 787532.

- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J.-P., Ruiz-Filippi, G., & Trably, E. (2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(2), 158-181.
- Chakraborty, S., Aggarwal, V., Mukherjee, D., & Andras, K. (2012). Biomass to biofuel: A review on production technology: BIOMASS TO BIOFUEL. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 7, S254-S262.
- Chang, A. C. C., Tu, Y. H., Huang, M. H., Lay, C. H., & Lin, C. Y. (2011). Hydrogen production by the anaerobic fermentation from acid hydrolyzed rice straw hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 14280-14288.
- Chen, H. (2014). Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose. En H. Chen, *Biotechnology of Lignocellulose* (pp. 25-71). Springer Netherlands.
- Chen, X., Zhai, R., Li, Y., Yuan, X., Liu, Z.-H., & Jin, M. (2020). Understanding the structural characteristics of water-soluble phenolic compounds from four pretreatments of corn stover and their inhibitory effects on enzymatic hydrolysis and fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 13, 44.
- Cheng, C. L., Lo, Y. C., Lee, K. S., Lee, D. J., Lin, C. Y., & Chang, J. S. (2011). Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock. *Bioresource Technology*, 102(18), 8514-8523.
- Connor Fernandez. (2023, mayo 23). Todo lo que tenés que saber sobre el hidrógeno verde en Argentina y el mundo. *El Rompehielos*.
- Das, D., & Veziroğlu, T. N. (2001). Hydrogen production by biological processes: A survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26(1), 13-28.
- Davila-Vazquez, G., Alariste-Mondragón, F., De León-Rodríguez, A., & Razo-Flores, E. (2008). Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19), 4989-4997.
- Denaday F., Escartín C., Parodi G., & Spinazzola E. (2020). Actualización del balance de biomasa con fines energéticos en la Argentina. *FAO. Colección de Documentos Técnicos*.
- Deschatelets, L., & Yu, E. K. C. (1986). A simple pentose assay for biomass conversion studies. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1986 24:5, 24(5), 379-385.
- Díaz, B. (1995). Extracción del Aceite de Jojoba. En *Ingeniería Industrial* (pp. 37-52).
- Diaz-Garcia, L., Huang, S., Sproer, C., Sierra-Ramírez, R., Bunk, B., Overmann, J., Jimenez, D. J., & Overmann, J. (2021). Dilution-to-Stimulation/Extinction Method: A Combination Enrichment Strategy To Develop a Minimal and Versatile Lignocellulolytic Bacterial Consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(2), 1-15.
- Dinesh, G. K., Chauhan, R., & Chakma, S. (2018). Influence and strategies for enhanced biohydrogen production from food waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92, 807-822.
- Dirección Nacional de Proyectos Estratégicos. (2023, marzo 16). *Tecnología nacional para la producción de hidrógeno a partir de fuentes renovables*. Argentina.gob.ar.
- Dodds, P. E., Staffell, I., Hawkes, A. D., Li, F., Grünewald, P., McDowall, W., & Ekins, P. (2015). Hydrogen and fuel cell technologies for heating: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(5), 2065-2083.
- Dzulkarnain, E. L. N., Audu, J. O., Wan Dagang, W. R. Z., & Abdul-Wahab, M. F. (2022). Microbiomes of biohydrogen production from dark fermentation of industrial wastes: Current trends, advanced tools and future outlook. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(1), 16.
- El Hajj Chehade, A. M., Daher, E. A., Assaf, J. C., Riachi, B., & Hamd, W. (2020). Simulation and optimization of hydrogen production by steam reforming of natural gas for refining and petrochemical demands in Lebanon. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(58), 33235-33247.

European Commission, (2020). *Communication from the commission to the european parliament, the council, the european economic and social committee and the committee of the regions*.

European Biogas Association. (2023). *Activity Report 2023*.

García, R. E., Martínez, V. L., Franco, J. I., & Curutchet, G. (2012). Selection of natural bacterial communities for the biological production of hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(13), 10095-10100.

García, R. E., Pin Viso, N., Gerosa, F. A., Nishinakamasu, V., Puebla, A. F., Farber, M. D., & Lavorante, M. J. (2023). Argentine Navy Icebreaker Ship “Almirante Irizar” Sludge Microbial Composition Analysis for Biohydrogen Production. *BioEnergy Research*, 16(2), 1217-1228.

Gauto Acosta M., Ferlijwskyj I., & Galmarini M. (2021). *Residuos de poda a biomasa energética*. Lignis.

Germec, M., Ilgin, M., İlhan, E., & Turhan, I. (2016). Optimization of acidic hydrolysis conditions of rice husk for fermentable sugar production. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 38(20), 3103-3108.

Gonzales, R. R., & Kim, S.-H. (2017). Dark fermentative hydrogen production following the sequential dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of rice husk. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(45), 27577-27583.

González-Pajuelo, M., Meynial-Salles, I., Mendes, F., Soucaille, P., & Vasconcelos, I. (2006). Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol: Physiological Comparison of a Natural Producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an Engineered Strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 96-101.

Gungormusler-Yilmaz, M., Shamshurin, D., Grigoryan, M., Taillefer, M., Spicer, V., Krokhin, O. V., Sparling, R., & Levin, D. B. (2014). Reduced catabolic protein expression in *Clostridium butyricum* DSM 10702 correlate with reduced 1,3-propanediol synthesis at high glycerol loading. *AMB Express*, 4(1), 63.

Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., & Steyer, J.-P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10660-10673.

Gwak, K.-S., Yoon, C.-H., Kim, J.-C., Kim, J.-H., Cho, Y.-M., & Choi, I.-G. (2022). Conversion of Glucose and Xylose to 5-Hydroxymethyl furfural, Furfural, and Levulinic Acid Using Ethanol Organosolv Pretreatment under Various Conditions. *Journal of the Korean Wood Science and Technology*, 50(6), 475-489.

Han, W., Fang, J., Liu, Z., & Tang, J. (2016). Techno-economic evaluation of a combined bioprocess for fermentative hydrogen production from food waste. *Bioresource Technology*, 202, 107-112.

Hao, X., Wang, Q., Zhang, X., Cao, Y., & Mark Loosdrecht, C. M. V. (2009). Experimental evaluation of decrease in bacterial activity due to cell death and activity decay in activated sludge. *Water Research*, 43(14), 3604-3612.

Harmsen, P., Huijgen, W., Bermudez, L., & Bakker, R. (2010). *Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass*.

Henry, R. (1974). *Clinical Chemistry, principles and Techniques, 2nd Edition*, Harper and Row.

Honarmandrad, Z., Kucharska, K., & Gębicki, J. (2022). Processing of Biomass Prior to Hydrogen Fermentation and Post-Fermentative Broth Management. *Molecules*, 27(21), 7658.

InfoCampo. (2021, julio 20). *Jojoba: Propiedades, beneficios y mercados para una economía regional sin retenciones*.

International Energy Agency. (2018). *Hydrogen production costs using natural gas in selected regions*. IEA.

Isikgor, F. H. & Becer, C. R. (2015). Lignocellulosic biomass: A sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, 6(25), 4497-4559.

Jang, Y.-S., Lee, J. Y., Lee, J., Park, J. H., Im, J. A., Eom, M.-H., Lee, J., Lee, S.-H., Song, H., Cho, J.-H., Seung, D. Y., & Lee, S. Y. (2012). Enhanced Butanol Production Obtained by Reinforcing the Direct Butanol-Forming Route in *Clostridium acetobutylicum*. *mBio*, 3(5), 10.1128/mbio.00314-12.

Jędrzejczyk, M., Soszka, E., Czapnik, M., Ruppert, A. M., & Grams, J. (2019). Physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. En *Second and Third Generation of Feedstocks* (pp. 143-196). Elsevier.

Jung, K.-W., Kim, D.-H., & Shin, H.-S. (2010). Continuous fermentative hydrogen production from coffee drink manufacturing wastewater by applying UASB reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24), 13370-13378.

Kamal, S. M. M., Mohamad, N. L., Abdullah, A. G. L., & Abdullah, N. (2011). Detoxification of sago trunk hydrolysate using activated charcoal for xylitol production. *Procedia Food Science*, 1, 908-913.

Kang, Q., Appels, L., Tan, T., & Dewil, R. (2014). Bioethanol from lignocellulosic biomass: Current findings determine research priorities. *The Scientific World Journal*, 2014, 298153.

Kordala, N., Lewandowska, M., & Bednarski, W. (2023). Effect of the method for the elimination of inhibitors present in *Miscanthus giganteus* hydrolysates on ethanol production effectiveness. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(3), 2089-2097.

Kumar, N., Ghosh, A., & Das, D. (2001). Redirection of biochemical pathways for the enhancement of H<sub>2</sub> production by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnology Letters*, 23(7), 537-541.

Kurrer, C. (2020). *The potential of hydrogen for decarbonising steel production*.

Lau, B. B. Y., Luis, E. T., Hossain, M. M., Hart, W. E. S., Cencia-Lay, B., Black, J. J., To, T. Q., & Aldous, L. (2015). Facile, room-temperature pre-treatment of rice husks with tetrabutylphosphonium hydroxide: Enhanced enzymatic and acid hydrolysis yields. *Bioresource Technology*, 197, 252-259.

Lay, C.-H., Hsu, Y.-C., Lin, C.-Y., & Chen, C.-C. (2020). Anaerobic Biohydrogen Production Using Rice Husk-Based Biologics. *Waste and Biomass Valorization*, 11(3), 1059-1068.

Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., & Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by *Clostridia*. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(2), 209-228.

Lewis, A. (2021). Pollution from hydrogen fuel could widen inequality. *Nature*, 595(7867), 353-353.

Li, C., & Fang, H. H. P. (2007). Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37(1), 1-39.

Li, Y.-C., Liu, Y.-F., Chu, C.-Y., Chang, P.-L., Hsu, C.-W., Lin, P.-J., & Wu, S.-Y. (2012). Techno-economic evaluation of biohydrogen production from wastewater and agricultural waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20), 15704-15710.

Lin, C.-Y., & Chang, R.-C. (1999). Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 74(6), 498-500.

Lin, Z., Huang, H., Zhang, H., Zhang, L., Yan, L., & Chen, J. (2010). Ball milling pretreatment of corn stover for enhancing the efficiency of enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(7), 1872-1880.

Liu, H., Zhang, J., Yuan, J., Jiang, X., Jiang, L., Zhao, G., Huang, D., & Liu, B. (2019). Omics-based analyses revealed metabolic responses of *Clostridium acetobutylicum* to lignocellulose-derived inhibitors furfural, formic acid and phenol stress for butanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 12, 101.

Liu, X., Zhu, Y., & Yang, S.-T. (2006). Construction and characterization of ack deleted mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid and hydrogen production. *Biotechnology Progress*, 22(5), 1265-1275.

Logan, B. E., Oh, S. E., Kim, I. S., & Van Ginkel, S. (2002). *Biological Hydrogen Production Measured in Batch Anaerobic Respirometers. Environmental Science & Technology* 36, 2530–2535.

Lopez, C., Pons, M. N., & Morgenroth, E. (2006). Endogenous processes during long-term starvation in activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. *Water Research*, 40(8), 1519-1530.

Łukajtis, R., Hołowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., & Kamiński, M. (2018). Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 665-694.

Maciel, C. Á. (2009). Biocombustibles: Desarrollo histórico-tecnológico. *Economía Informa*.

Manterola B., H., Cerda A., D., Mira J., J., & Fundación para la Innovación Agraria (Chile). (1999). *Los residuos agrícolas y su uso en la alimentación de rumiantes*.

Martínez, V. L., Salierno, G. L., García, R. E., Lavorante, M. J., & Galvagno, Miguel A. Cassanello, M. C. (2022). Biological Hydrogen Production by Dark Fermentation in a Stirred Tank Reactor and Its Correlation with the pH Time Evolution. *Catalysts*, 12(11), 1366.

Mateo, J. & Suster, M. (2021). *Hacia la economía del hidrógeno. Perspectivas de la agenda internacional y las oportunidades locales*.

Millati, R., Niklasson, C., & Taherzadeh, M. J. (2002). Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 38(4), 515-522.

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.

Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., & Noike, T. (2000). Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource Technology*, 73(1), 59-65.

Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Quéméneur, M., Trably, E., Steyer, J.-P., & Carrère, H. (2014). Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 32(5), 934-951.

Moon, C., Jang, S., Yun, Y.-M., Lee, M.-K., Kim, D.-H., Kang, W.-S., Kwak, S.-S., & Kim, M.-S. (2015). Effect of the accuracy of pH control on hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, 179, 595-601.

Morimoto, M. (2004). Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(7), 709-713.

Ndaba, B., Chiyanzu, I., & Marx, S. (2015). n-Butanol derived from biochemical and chemical routes: A review. *Biotechnology Reports*, 8, 1-9.

NETL. (2004). *Seventh Edition Fuel Cell Handbook* (DOE/NETL-2004/1206). National Energy Technology Laboratory, Pittsburgh, PA, and Morgantown, WV (US).

Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., & Ohba, M. (2002). Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11), 1367-1371.

Norrahim, M. N. F., Ilyas, R. A., Nurazzi, N. M., Rani, M. S. A., Atikah, M. S. N., & Shazleen, S. S. (2021). *Chemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for the Production of Bioproducts: An Overview*.

O'Hayre, R., Suk-Won Cha, Whitney Colella, & Fritz B. Prinz. (2016, junio). *Fuel Cell Fundamentals, 3rd Edition*, Wiley. Wiley.Com.

Parawira, W., & Tekere, M. (2011). Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(1), 20-31.

Park, J.-H., Kim, D.-H., Kim, H.-S., Wells, G. F., & Park, H.-D. (2019). Granular activated carbon supplementation alters the metabolic flux of *Clostridium butyricum* for enhanced biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 281, 318-325.

- Perera, R., Ketheesan, B., Venkataramana, G., & Khandan, N. (2010). Fermentative biohydrogen production: Evaluation of net energy gain. *International Journal of Hydrogen Energy*, *35*, 12224-12233.
- Perrachón, J. (2004). Siembra Directa: ¿qué es? *Revista del Plan Agropecuario*, *Nº 110*, 54-57.
- Prakasham, R. S., Brahmaiah, P., Sathish, T., & Sambasiva Rao, K. R. S. (2009). Fermentative biohydrogen production by mixed anaerobic consortia: Impact of glucose to xylose ratio. *International Journal of Hydrogen Energy*, *34*(23), 9354-9361.
- Qi, N., Hu, X., Zhao, X., Li, L., Yang, J., Zhao, Y., & Li, X. (2018). Fermentative hydrogen production with peanut shell as supplementary substrate: Effects of initial substrate, pH and inoculation proportion. *Renewable Energy*, *127*, 559-564.
- Quéménéur, M., Hamelin, J., Barakat, A., Steyer, J.-P., Carrère, H., & Trably, E. (2012). Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, *37*(4), 3150-3159.
- Reaume, S. (2009). *Fermentation of Glucose and Xylose to Hydrogen in the Presence of Long Chain Fatty Acids*.
- Roberto, I. C., Laci, L. S., Barbosa, M. F. S., & de Mancilha, I. M. (1991). Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol. *Process Biochemistry*, *26*(1), 15-21.
- Rorke, D., & Gueguim Kana, E. B. (2016). Biohydrogen process development on waste sorghum (*Sorghum bicolor*) leaves: Optimization of saccharification, hydrogen production and preliminary scale up. *International Journal of Hydrogen Energy*, *41*(30), 12941-12952.
- Sarangi, P. K., & Nanda, S. (2020). Biohydrogen Production Through Dark Fermentation. *Chemical Engineering & Technology*, *43*(4), 601-612.
- Sarawan, C., Suinyuy, T. N., Sewsynker-Sukai, Y., & Gueguim Kana, E. B. (2019). Optimized activated charcoal detoxification of acid-pretreated lignocellulosic substrate and assessment for bioethanol production. *Bioresource Technology*, *286*, 121403.
- Sattar, A., Arslan, C., Ji, C., Sattar, S., Umair, M., Sattar, S., & Bakht, M. Z. (2016). Quantification of temperature effect on batch production of bio-hydrogen from rice crop wastes in an anaerobic bio reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, *41*(26), 11050-11061.
- Shanmugam, S., Hari, A., Ulaganathan, P., Yang, F., Krishnaswamy, S., & Wu, Y.-R. (2018). Potential of biohydrogen generation using the delignified lignocellulosic biomass by a newly identified thermostable laccase from *Trichoderma asperellum* strain BPLMBT1. *International Journal of Hydrogen Energy*, *43*(7), 3618-3628.
- Si, B., Liu, Z., Zhang, Y., Li, J., Xing, X.-H., Li, B., Duan, N., & Lu, H. (2015). Effect of reaction mode on biohydrogen production and its microbial diversity. *International Journal of Hydrogen Energy*, *40*(8), 3191-3200.
- Silva, J. S., Mendes, J. S., Correia, J. A. C., Rocha, M. V. P., & Micoli, L. (2018). Cashew apple bagasse as new feedstock for the hydrogen production using dark fermentation process. *Journal of Biotechnology*, *286*, 71-78.
- Sims, R. E. H., Mabee, W., Saddler, J. N., & Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, *101*(6), 1570-1580.
- Singh, A., Sevda, S., Abu Reesh, I. M., Vanbroekhoven, K., Rathore, D., & Pant, D. (2015). Biohydrogen Production from Lignocellulosic Biomass: Technology and Sustainability. *Energies*, *8*(11), Article 11.
- Sivagurunathan, P., Kumar, G., Mudhoo, A., Rene, E. R., Saratale, G. D., Kobayashi, T., Xu, K., Kim, S.-H., & Kim, D. H. (2017). Fermentative hydrogen production using lignocellulose biomass: An overview of pre-

treatment methods, inhibitor effects and detoxification experiences. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 77, 28-42.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2008). *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised July 2011)*. [http://www.nrel.gov/biomass/analytical\\_procedures.html](http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html)

Soares, J. F., Confortin, T. C., Toderó, I., Mayer, F. D., & Mazutti, M. A. (2020). Dark fermentative biohydrogen production from lignocellulosic biomass: Technological challenges and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 117, 109484.

Tai, J., Adav, S. S., Su, A., & Lee, D. J. (2010). Biological hydrogen production from phenol-containing wastewater using *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24), 13345-13349.

Tsygankov, A. A., Kosourov, S. N., Tolstygina, I. V., Ghirardi, M. L., & Seibert, M. (2006). Hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(11), 1574-1584.

UNODC. (2010). Oficina de Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*.

U. S. Department of Energy. (2020). *Hydrogen Strategy—Enabling a Low Carbon Economy*.

U. S. Department of Energy. (2023). *Hydrogen Production: Electrolysis*. Energy.Gov.

Ugheoke, I. B. (2012). A critical assessment and new research directions of rice husk silica processing methods and properties. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 6(03), 430-448.

Ummalyma, S. B., Supriya, R. D., Sindhu, R., Binod, P., Nair, R. B., Pandey, A., & Gnansounou, E. (2019). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—Current trends and future perspectives. En *Second and Third Generation of Feedstocks* (pp. 197-212). Elsevier.

U.S. Department of Energy. (2020, junio). *DOE Announces New Lab Consortia to Advance Hydrogen and Fuel Cell R&D*. Energy.Gov.

U.S. Department of Energy. (2021). *Hydrogen Shot*. Energy.Gov.

U.S. Department of Energy. (2023). *Fuel Cells*. Energy.Gov.

Van Ginkel, S., & Logan, B. E. (2005). Inhibition of Biohydrogen Production by Undissociated Acetic and Butyric Acids. *Environmental Science and Technology*, 39(23), 9351-9356.

Van Renssen, S. (2020). The hydrogen solution. *Nature Climate Change*, 10(9), Article 9.

Wang, A., Gao, L., Ren, N., Xu, J., Liu, C., & Lee, D. J. (2010). Enrichment strategy to select functional consortium from mixed cultures: Consortium from rumen liquor for simultaneous cellulose degradation and hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24), 13413-13418.

Wang, J., & Yin, Y. (2019). Progress in microbiology for fermentative hydrogen production from organic wastes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 49(10), 825-865.

Wang, J., & Yin, Y. (2021). *Clostridium* species for fermentative hydrogen production: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(70), 34599-34625.

Wiegel, J., Tanner, R., & Rainey, F. A. (2006). An Introduction to the Family Clostridiaceae. En M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria* (pp. 654-678). Springer US.

Xu, J.-F., Ren, N.-Q., Wang, A.-J., Qiu, J., Zhao, Q.-L., Feng, Y.-J., & Liu, B.-F. (2010). Cell growth and hydrogen production on the mixture of xylose and glucose using a novel strain of *Clostridium* sp. HR-1 isolated from cow dung compost. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24), 13467-13474.

- Yang, G., & Wang, J. (2018). Pretreatment of grass waste using combined ionizing radiation-acid treatment for enhancing fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*, 255, 7-15.
- Yu, H. (2002). Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12), 1359-1365.
- Yu, J., & Takahashi, P. (2007). Biophotolysis-based Hydrogen Production by Cyanobacteria and Green Microalgae. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 1.
- Zhang, Y., Xia, C., Lu, M., & Tu, M. (2018). Effect of overliming and activated carbon detoxification on inhibitors removal and butanol fermentation of poplar prehydrolysates. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 178.
- Zheng, J., Tashiro, Y., Wang, Q., & Sonomoto, K. (2015). Recent advances to improve fermentative butanol production: Genetic engineering and fermentation technology. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(1), 1-9.

## **DECLARACIÓN**

Se certifica que este documento corresponde a la **versión final** de la Tesis, **sin modificaciones**, ya que **los jurados no indicaron realizar cambios** en su evaluación.

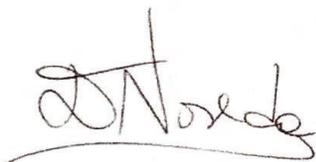
Asimismo, se confirma que esta versión ha sido **revisada y aprobada** por el tribunal evaluador, cumpliendo con todos los requisitos estipulados para su presentación y depósito en el Repositorio Institucional.

**Firma del Tesista:**



Valentino Mórtola

**Firma del Director:**



Diego G. Noseda

**Firma del Co-Director:**



Rodrigo E. García

**Fecha: 25 / 09 / 2024**