

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 jobo, 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 H₂ se consiguió con 75 % y 100 % (v/v) de hidrolizado detoxificado (2,58 mg H₂/g azúcares reductores), en comparación con los cultivos control en medio definido de Logan (0,32 mg H₂/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 H₂/L h y un rendimiento de 8,0 mg H₂/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 H₂/L h y un rendimiento de 3,9 mg H₂/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 H₂ production yield was achieved with 75 % and 100 % (v/v) detoxified hydrolysate (2.58 mg

H₂/g reducing sugars), compared to control cultures in defined Logan's medium (0.32 mg H₂/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 H₂/L h and a yield of 8.0 mg H₂/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 H₂/L h and a yield of 3.9 mg H₂/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.