

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

División de Ciencias Ambientales

**“Producción de Hidrógeno a Partir de Residuos
Agrícolas por vía Fermentativa”**

Tesis que presenta

Iván Napoleón Sánchez Carrasco

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Aplicadas

En la opción de

Ciencias Ambientales

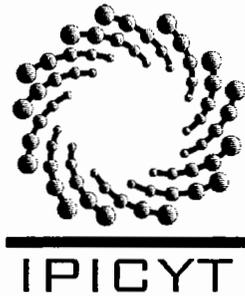
Director de la Tesis:

Dr. Felipe Alatraste Mondragón

Asesores:

Dr. Elías Razo Flores y Dra. Ma. de Lourdes Berenice Celis García

San Luís Potosí, S.L.P., Noviembre de 2007



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Producción de hidrógeno a partir de residuos agrícolas por vía fermentativa**" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales fue elaborada por **Iván Napoleón Sánchez Carrasco** y aprobada el **01 de Noviembre de 2007** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Felipe Alatraste Mondragón
(Director de la tesis)

Dr. Elías Razo Flores
(Asesor de la tesis)

Dra. Ma. De Lourdes Berenice Celis García
(Asesor de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Felipe Alatraste Mondragón y la asesoría de los doctores Dr. Elías Razo Flores y Dra. Ma. De Lourdes Berenice Celis García.

Durante la realización de este trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-202436) así como apoyo financiero para la elaboración de los experimentos, obtenido a través del proyecto FMSLP-2005-C01-23.

El programa de Maestría en Ciencias Aplicadas con especialidad en Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica se encuentra inscrito dentro del Programa Institucional de Fomento al Posgrado del CONACYT.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 016 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 26 días del mes de noviembre del año 2007, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Elías Razo Flores	Presidente	IPICYT
Dra. María de Lourdes Berenice Celis García	Secretaria	IPICYT
Dr. Alberto Flores Martínez	Sinodal externo	U. de Gto.
Dr. Felipe Alatraste Mondragón	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS APLICADAS
EN LA OPCIÓN DE CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó el C.

Iván Napoleón Sánchez Carrasco

sobre la Tesis intitulada:

Producción de Hidrógeno a Partir de Residuos Agrícolas por Vía Fermentativa

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Felipe Alatraste Mondragón

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 14:35 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 26 días del mes noviembre de 2007.

L.C.C. Ivonne Lizetta Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



A mi madre y a mis hermanos por todo su apoyo y cariño

A mi abuela (†) que siempre me alentó a seguir adelante

Agradecimientos

A Mónica por ser mi compañera y brindarme su cariño y amor durante todo este tiempo.

A mi director y a mis asesores de tesis por haberme apoyado con sus conocimientos a lo largo de la elaboración de esta tesis. Al Dr. Felipe Alatraste por apoyarme y compartir sus conocimientos. Al Dr. Elías Razo Flores, a la Dra. Berenice Celis García y al Dr. Alberto Flores Martínez por todo el apoyo brindado.

Así como también, a todos mis amigos y doctores que durante el tiempo en que realice mis estudios me brindaron su apoyo y amistad. Especialmente a Gustavo Dávila, Guillermo Andrade, Carlos Molina, Iván Padilla, José Luís Dávila, José Arenas, Belém, Margarita, a la Dra. Sonia Arriaga, la M.C. Dulce Partida y a la Dra. Elisabeth Huber-Sannwald

Índice

Índice de tablas	ix
Índice de figuras	x
Resumen	xii
Abstract	xiii
Capítulo I. Introducción	1
Capitulo II. Antecedentes	3
2.1 Hidrógeno a partir de biomasa	3
2.1.1 Tipos de materiales de deshecho empleados para la producción fermentativa de hidrógeno	3
2.1.2 Estructura y organización de principales compuestos presentes en los desechos agrícolas	4
2.1.2.1 Fracción soluble	6
2.1.2.2 Componentes estructurales	7
2.1.3 Degradación biológica de los principales componentes de los desechos agrícolas	12
2.1.3.1 Degradación de celulosa	12
2.1.3.2 Degradación de hemicelulosa	13
2.1.3.3 Degradación de lignina	13
2.2 Mecanismos de la producción de hidrógeno	14
2.2.1 Aspectos generales de la producción biológica de hidrógeno	14
2.3 Fermentación	15
2.3.1 Hidrólisis	15
2.3.2 Acidogénesis	16
2.3.3 Microbiología de la producción de hidrógeno	17
2.3.4 Sustratos empleados para la producción de hidrógeno	19
2.4 Rutas metabólicas en la producción de hidrógeno	21
2.4.1 Partición de equivalentes reductores	21
2.4.2 Fermentación de acetato y butirato	23
2.4.3 Fermentación de propianato	25
2.4.4 Fermentación de solventogénesis	26
2.4.5 Productos de la fermentación de xilosa	28
2.5 Factores ambientales que afectan la producción de hidrógeno	29
2.5.1 Valores de pH inicial	30
2.5.2 Presión parcial de hidrógeno	31
2.5.3 Concentración de hierro	33
2.5.4 Nutrientes y materiales tóxicos	33
2.5.5 Temperatura	33
2.6 Rendimientos y cinética de producción de hidrógeno	34
1.1 Justificación	36
1.2 Hipótesis	36
1.3 Objetivo general	36
1.4 Objetivos específicos	36
Capitulo III. Materiales y Métodos	38

3.1	Materiales	38
3.1.1	Medio mineral	38
3.1.2	Sustratos modelo	38
3.1.3	Sustrato lignocelulósico	38
3.1.4	Fuente de inóculo	38
3.2	Métodos	39
3.2.1	Preparación del inóculo	39
3.2.2	Conteo de esporas	39
3.2.3	Pretratamiento químico de los desechos agrícolas	40
3.2.3.1	Tratamiento ácido	40
3.2.4	Ensayos en lote	40
3.2.4.1	Descripción del ensayo	40
3.2.4.2	Cuantificación y composición del biogás	41
3.2.4.3	Análisis de datos	42
3.2.4.3.1	Ecuación de Gompertz	42
3.2.4.3.1	Análisis de varianza (ANOVA)	43
3.2.5	Métodos analíticos	43
3.2.5.1	Electroforesis capilar	43
3.2.5.2	Carbono orgánico total (COT)	44
3.2.5.3	Análisis de hemicelulosa, celulosa y lignina presentes en los desechos agrícolas	44
3.2.5.3.1	Fibra detergente neutro (FDN)	45
3.2.5.3.2	Fibra detergente ácido (FDA)	45
3.2.5.3.3	Lignina detergente ácido (LDA)	45
3.2.5.4	Sólidos totales y volátiles	45
Capítulo IV. Resultados y Discusión		47
4.1	Efecto del medio mineral y del tipo de inóculo utilizado en la producción de hidrógeno	47
4.2.	Optimización de las condiciones de crecimiento del inóculo	50
4.2.1	Efecto del valor del pH inicial en la producción de hidrógeno	50
4.2.2	Efecto de la cantidad de inóculo en la producción de hidrógeno	51
4.2.3	Efecto de la temperatura sobre la producción de hidrógeno	52
4.3	Cinética de producción de hidrógeno a partir de azúcares presentes en desechos agrícolas	53
4.3.1	Glucosa	53
4.3.2	Xilosa	57
4.4	Pretratamiento ácido en los desechos agrícolas	61
4.5	Cinética de la producción de hidrógeno a partir de azúcares presentes en los hidrolizados líquidos	63
4.6	Cinética de la producción de hidrógeno a partir de desechos de maíz y de trigo	69
Capítulo V. Conclusiones y perspectivas		76
Referencias bibliográficas		79

Lista de tablas

Tabla 2.1	Microorganismos anaerobios reportados para la producción de hidrógeno.	18
Tabla 2.2	Comparación de tipos de microorganismos empleados, rendimientos y tasas de producción de hidrógeno.	35
Tabla 4.1	TVPH y HY obtenidas en los experimentos en lote para la selección del tipo de medio mineral y fuente de inóculo.	49
Tabla 4.2	TVPH y HY obtenidas en experimentos en lote para la evaluación de a cantidad de esporas.	52
Tabla 4.3	TVPH y HY obtenidas en los experimentos en lote a diferentes temperaturas.	53
Tabla 4.4	Composición proximal de los desechos agrícolas antes de la hidrólisis ácido/térmica.	61
Tabla 4.5	Cantidad de glucosa y xilosa obtenida a partir de la hidrólisis ácido/térmica de 100 g de desecho	62
Tabla 4.6	Composición proximal del material residual sólido obtenido después de la hidrólisis ácido/térmica.	62
Tabla 4.7	Balance del carbono orgánico total (COT) de las fracciones (líquidas y sólidas) generadas durante la hidrólisis de los desechos de maíz.	63
Tabla 4.8	Balance del carbono orgánico total (COT) de las fracciones (líquidas y sólidas) generadas durante la hidrólisis de los desechos de trigo.	63
Tabla 4.9	HY obtenido a partir de azúcares presentes en los hidrolizados líquidos de maíz y trigo.	65
Tabla 4.10	TVPH obtenido a partir de azúcares presentes en los hidrolizados líquidos de maíz y trigo.	66
Tabla 4.11	Concentración de AGV's (mM) generados en la fermentación del hidrolizado líquido de maíz para producir hidrógeno.	67
Tabla 4.12	Concentración de AGV's (mM) generados en la fermentación del hidrolizado líquido de trigo para producir hidrógeno.	67
Tabla 4.13	Cociente Ac/Bu obtenido a partir de la concentración de AGV's producidos durante la fermentación de los hidrolizados.	69
Tabla 4.14	Cociente Ac/Bu obtenido a partir de la concentración de AGV's producidos durante la fermentación de los desechos.	74
Tabla 4.15	Comparación de los rendimientos calculados en base a cantidad (base seca) de desecho añadido obtenidos con los hidrolizados líquidos y los desechos sin tratar.	75

Lista de figuras

Figura 2.1	Composición de la pared celular vegetal y análisis que determina cada fracción.	6
Figura 2.2	Esquema general de la molécula de celulosa (Dumitriu, 2005).	7
Figura 2.3	Estructura de las microfibrillas de celulosa: (a) baja cristalinidad; (b) alta cristalinidad; (c) modelos plegados (Dumitriu, 2005).	8
Figura 2.4	Estructura de la hemicelulosa: a) Segmento de xilano; b) segmento de glucomanano; c) segmento de arabinogalactano (Dumitriu, 2005).	9
Figura 2.5	Esquema general de la molécula de lignina (Kira y Farrell, 1987).	11
Figura 2.6	Esquema general de la degradación de la celulosa (modificada de Dumitriu, 2005).	13
Figura 2.7	Ruta metabólica de producción de hidrógeno, acetato y butirato a partir de glucosa por medio de <i>Clostridium butyricum</i> bajo condiciones anaerobias. (Modificada de Chen, et al., 2006).	22
Figura 2.8	Ruta metabólica de fermentación de acetato y butirato por Clostridia a partir de glucosa. (Dworkin, et al., 2006).	24
Figura 2.9	Ruta metabólica de la fermentación de acetato a partir de glucosa por <i>C. aceticum</i> (Zeikus, 1980).	25
Figura 2.10	Ruta metabólica de la fermentación de glucosa y ácido láctico por Propionobacteria (Dworkin, et al., 2006).	26
Figura 2.11	Fermentación de etanol a partir de glucosa por medio de la ruta de Entner-Doudoroff presente en Levaduras, Acetobacterias y Zimomonas (Zeikus, 1980).	27
Figura 2.12	Fermentación de etanol a partir de glucosa por medio de la ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas presente en Clostridia, Enterobacterias y bacterias heterolácticas (Zeikus, 1980).	28
Figura 2.13	Ruta metabólica de producción de hidrogeno utilizando <i>C. tyrobutyricum</i> a partir de xilosa como sustrato (Zhu y Yang, 2004).	29
Figura 2.14	Efecto de la presión parcial de hidrógeno en la producción biológica de hidrogeno. (Angenent, et al., 2004).	32
Figura 3.1	Fotografía del dispositivo para la cuantificación del biogás producido durante el proceso de fermentación.	41
Figura 3.2	Esquema general de la determinación de hemicelulosa, celulosa y lignina en los desechos agrícolas.	44
Figura 4.1	Perfiles de producción de hidrógeno con a) ensilado de Rye grass y b) ensilado de rastrojo de maíz y olote como inóculo usando tres medios de cultivo	48
Figura 4.2	Rendimiento de la producción de hidrógeno a diferentes valores de pH iniciales.	50
Figura 4.3	Tasa volumétrica de producción de hidrógeno a diferentes valores de pH iniciales.	51
Figura 4.4	a) H_{max} y b) pH y AGV's final en cada una de las	

	concentraciones utilizadas de glucosa.	54
Figura 4.5	a) Concentración final de AGV y relación Acético/Butírico y b) Cantidad de glucosa añadida y residual en cada uno de los experimentos	55
Figura 4.6	HY en la producción de hidrógeno a partir de glucosa.	56
Figura 4.7	TVPH en la producción de hidrógeno a partir de glucosa.	57
Figura 4.7	a) H_{max} y b) pH y AGV's final en cada una de las concentraciones utilizadas de xilosa.	58
Figura 4.8	a) Concentración final de AGV's y relación Acético/Butírico, y b) Xilosa añadida y xilosa residual en cada uno de los experimentos.	59
Figura 4.9	HY en la producción de hidrógeno a partir de xilosa.	60
Figura 4.10	TVPH en la producción de hidrógeno a partir de xilosa.	61
Figura 4.10	Producción acumulativa de hidrógeno a partir del líquido hidrolizado del maíz.	64
Figura 4.11	Producción acumulativa de hidrógeno a partir del líquido hidrolizado del trigo.	65
Figura 4.12	Producción acumulativa de hidrógeno a partir de desecho de maíz.	69
Figura 4.13	Producción acumulativa de hidrógeno a partir de rastrojo de trigo.	70
Figura 4.14	HY obtenido en la producción de hidrógeno a partir de desecho de maíz.	71
Figura 4.15	HY obtenido en la producción de hidrógeno a partir de desecho de trigo.	71
Figura 4.16	TVPH obtenida en la producción de hidrógeno obtenida a partir de desechos de maíz.	72
Figura 4.17	TVPH obtenida en la producción de hidrógeno obtenida a partir de desechos de trigo.	72
Figura 4.18	Concentración de AGV's en la fermentación de desecho de maíz.	73
Figura 4.19	Concentración de AGV's en la fermentación de desecho de trigo.	73

Sánchez Carrasco, Iván Napoleón (2007). Producción de Hidrógeno a Partir de Residuos Agrícolas por vía Fermentativa. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. San Luís Potosí, México.

Resumen

Los desechos agrícolas son una fuente abundante de sustrato para la producción de hidrogeno, ya que estos desechos contienen una gran cantidad de carbohidratos poliméricos que pueden ser fermentados por microorganismos para producir hidrógeno. Sin embargo, una limitante en la utilización de estos desechos es su baja biodegradabilidad, debido a que los azúcares necesitan ser liberados de los polímeros que los contienen. Por ello, en este trabajo se comparó la producción de hidrógeno por vía fermentativa utilizando desechos de maíz y de trigo sin tratar, con aquella utilizando hidrolizados líquidos ácidos obtenidos a partir de estos desechos. Se encontró que la glucosa y la xilosa fueron los principales azucars presentes en los hidrolizados y que provinieron de la fracción de hemicelulosa. La fermentación se llevo a cabo utilizando un inóculo novedoso, no reportado en la literatura, obtenido de ensilado de Rye grass. Los rendimientos máximos obtenidos utilizando los hidrolizados líquidos de los desechos de maíz y de trigo fueron de 2.68 y 2.07 mol H₂/mol sustratos_{removidos} mientras que las tasas volumétricas máximas fueron de 1.746 y 1.241 mmol H₂/L-h respectivamente. Estos resultados permitieron concluir que el desecho de maíz es un mejor sustrato que el desecho de trigo para la producción de hidrógeno. El rendimiento de la producción de hidrógeno por gramo de desecho adicionado fue mayor para los hidrolizados ácidos que para los desechos sin tratar, para ambos residuos. Esto último indica que la utilización de los hidrolizados ácidos mejoró el rendimiento de la producción de hidrógeno. Se observó la formación de acetato y butirato durante la formación de hidrógeno a partir de sustratos modelo. Sin embargo, se observó la formación de propionato además de la de acetato y butirato cuando se emplearon residuos sin tratar. La formación de propionato se ha asociado a un bajo rendimiento de la producción de hidrógeno, por lo que los bajos rendimientos estimados durante la utilización de los residuos sin tratar se podrían explicar parcialmente por la formación de propionato. El mecanismo de formación de propionato a partir de los residuos empleados en este estudio no fue investigado pero es una observación que requiere ser investigada en trabajo futuro.

Sánchez Carrasco, Iván Napoleón (2007). Hydrogen production from agricultural waste by fermentative process. M. Sc. Thesis. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. San Luís Potosí, México.

Abstract

Agricultural wastes are a rich source of substrate for biohydrogen production, due their high content of carbohydrate polymers that can be used by fermentative microorganisms to produce hydrogen. However, a limiting factor in the utilization of agricultural residues is the poor biodegradability of these materials because sugars need to be released from polymeric materials before being fermented. Therefore, in this work biohydrogen production from corn strover and wheat straw without pretreatment was compared with that from liquid acid hydrolyzates obtained from the same wastes. It was found that glucose and xylose were the main sugars released from the hemicellulose fraction of the wastes. A novel microflora that has not been reported in the literature, obtained from Rye grass silage, was used as fermentative inoculum. Maximum hydrogen yields were 2.68 y 2.07 mol H₂/mol substrate_{removed} whereas maximum volumetric hydrogen production rates (VHPR) were 5.940 y 0.92 mmol H₂/L-h from liquid acid hydrolyzates of corn strover and wheat straw respectively. From these data, it was concluded that corn strover is a better substrate than wheat straw for hydrogen production. When maximum hydrogen yield was calculated per gram of waste added, the yield was higher for liquid acid hydrolyzate than for untreated wastes, for both residues (corn strover and wheat straw). This observation is and indication that the implementation of waste acid hydrolysis increased the performance of biohydrogen production. Acetate and butyrate were detected during biohydrogen production from model substrates (glucose and xylose). However, propionate was detected in addition to acetate and butyrate when untreated wastes were used for biohydrogen formation. Propionate formation has been associated with lower hydrogen yields. Therefore, propionate formation may partially explain the lower yields estimated in this work from untreated wastes. The mechanism of propionate formation from the untreated agricultural wastes under study was not investigated in this work but it is an important fact to be investigated in future research.

Capítulo I. Introducción

El uso de combustibles para la obtención de energías es una de las necesidades más comunes a través de la historia del hombre, ya que esta relacionado con todo lo que realiza o desea hacer. La energía, en sus numerosas formas útiles, es un elemento básico que influencia y limita los estándares de vida y el progreso de la tecnología. Es claramente un sistema de soporte para todos nosotros. A inicios del siglo XX el tema no recibía mucha atención, y no fue sino hasta finales de este cuando se le empezó a dar mayor importancia (la era del combustible fósil), y por lo general, solo recibía atención en algunas situaciones de crisis. Esto cambió a raíz de la alta tasa de consumo de combustibles fósiles, lo cual está llevando a un agotamiento acelerado de las reservas de petróleo, gas y carbón. La eventual escasez de estos combustibles llevará a una baja producción de energía la cual afectara de forma muy profunda la vida diaria de la sociedad.

Debido a lo anterior, se han creado numerosos proyectos para la investigación en el desarrollo de energías alternativas, ya que los combustibles fósiles además han provocado un fuerte impacto ambiental así como diversos trastornos económicos y sociales. Por lo tanto, el reto está en obtener energías alternativas y renovables que vayan sustituyendo paulatinamente a los combustibles fósiles. Como ejemplo: el empleo de energía solar, eólica, hídrica y la creación de combustibles a partir de biomasa (biocombustibles). La biomasa es una fuente natural de carbono extensamente disperso, que puede ser utilizada como una fuente amplia de materia prima para la generación de energía.

En los últimos años se han hecho diversas investigaciones para la obtención de biocombustibles a partir de biomasa y desechos orgánicos. Principalmente se ha puesto énfasis en la generación de biodiésel (Xu, et al., 2003; Mazzocchia, et al., 2006; Salis, et al., 2007), bioetanol (Chiaramonti, 2005; Pimentel y Patzek, 2005; Karakashev, 2007), biogás (Svensson, et al., 2006) e hidrógeno (Fan, et al., 2006; Zhang, et al., 2007).

En base a lo anterior, el presente trabajo se enfoca a la producción de hidrógeno a partir de desechos agrícolas, empleando un inóculo proveniente de forrajes ensilados. El fundamento es que existen pocos reportes en la literatura para la obtención de hidrógeno a partir de desechos agrícolas (Fan, et al., 2006; Zhang, et al., 2007; Datar, et al., 2007; Li y Chen, et al., 2007), ya que la mayoría de los reportes se han enfocado al estudio de la producción de hidrógeno a partir de sustratos modelos con inóculos distintos al empleado en este estudio (Fang y Liu, 2002; Zhang, et al., 2005; Lin y Lay, 2005; Liu, et al., 2006).

Capítulo II. Antecedentes

2.1 Hidrógeno a partir de biomasa

La biomasa es uno de los recursos renovables más abundantes en la naturaleza. En México, en el 2005 se produjo alrededor de 350,996 petajoules de energía a partir biomasa, principalmente por combustión de leña y bagazo de caña (SENER, 2007). Existe una gran variedad de recursos ricos en biomasa que pueden ser utilizados para la producción de combustibles alternos al petróleo (metano, bioetanol, biodiésel e hidrógeno). Estos recursos están divididos en cuatro categorías generales (Meng Ni, et al., 2006):

- 1) Cultivos energéticos: son aquellos desarrollados específicamente para la producción de combustibles, entre los que se encuentran los cultivos herbáceos (girasol, pasto), cultivos agrícolas (maíz, trigo, avena, sorgo) y plantas acuáticas (lirio).
- 2) Residuos agrícolas y desechos ganaderos.
- 3) Residuos y desechos forestales: comprenden la madera subutilizada y los residuos de tala, árboles comerciales imperfectos y árboles no comerciales que necesitan ser quitados de los bosques sobrepoblados.
- 4) Desechos municipales e industriales: desechos sólidos municipales, lodos de plantas de tratamiento y desechos industriales orgánicos.

El presente trabajo se enfocó a la utilización de desechos agrícolas, principalmente de maíz y de trigo como sustratos para la producción de hidrógeno por vía fermentativa.

2.1.1 Tipos de materiales de deshecho empleados para la producción fermentativa de hidrógeno

Muchos de los estudios reportados se han enfocado al estudio de la producción de hidrógeno a partir de azúcares simples tales como la glucosa (Fang y Liu, 2002; Liu, et al., 2006), sacarosa (Zhang, et al., 2005; Lin y Lay, 2005) y la lactosa (Collet, et al., 2006). Estos estudios han demostrado que este tipo de sustratos son fácilmente biodegradables. Debido a lo anterior, los materiales de desecho más adecuados para la producción de hidrógeno son aquellos con un

alto contenido de carbohidratos. Otros criterios adicionales son la disponibilidad, el costo, y la biodegradabilidad de los desechos.

Algunos desechos agrícolas que se han empleado para la producción de hidrógeno son: trigo (Fan, et al., 2006) y maíz (Datar, et al., 2007). Los desechos de industrias alimenticias tales como los residuos del procesamiento de papa, manzana y de confiterías fueron estudiados por Van Ginkel, et al., (2005). Mizuno, et al., (2000) utilizaron desechos del procesamiento de fríjol para la producción de hidrógeno. Todos estos desechos contienen almidón y/o materiales lignocelulósicos que son ricos en su contenido de carbohidratos. Sin embargo, la naturaleza compleja de estos subproductos afecta su biodegradabilidad. Por ejemplo, el almidón contenido en los desechos de industrias alimenticias es más fácil de procesar para la formación de carbohidratos e hidrógeno ya que el almidón se puede hidrolizar a glucosa y maltosa por hidrólisis ácida o enzimática, seguida por la conversión de dichos carbohidratos a ácidos orgánicos e hidrógeno. Por otra parte, los desechos agrícolas están constituidos principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. Este último es un compuesto recalcitrante que disminuye la biodegradabilidad de estos desechos. Debido a lo anterior este tipo de desechos se deben procesar por medio de métodos mecánicos, químicos o enzimáticos. Una vez deslignificados, la celulosa y hemicelulosa remanentes se pueden hidrolizar a carbohidratos, los cuales son fácilmente fermentables a hidrógeno, ácidos orgánicos y dióxido de carbono (Virije, et al., 2002).

2.1.2 Estructura y organización de los principales componentes presentes en los desechos agrícolas

Se denomina desecho agrícola a la fracción o fracciones de un cultivo que no constituyen la cosecha propiamente dicha y a aquella parte de la cosecha que no cumple con los requisitos de calidad mínima para ser comercializada como tal. Estos materiales presentan: a) un contenido hídrico muy variable según el desarrollo ontogénico del cultivo en la época de recolección, b) elevado contenido en materia orgánica, c) fracción mineral variable (principalmente fósforo y calcio), según el órgano o fracción de que se trate y dependiendo de las condiciones de cultivo, y d) relación C/N generalmente alta, aunque con

notables diferencias según la naturaleza y composición del residuo. La biodegradabilidad de estos materiales es función del contenido relativo en biomoléculas degradables (azúcares solubles y de bajo peso molecular, hemicelulosa y celulosa) y en componentes de lenta degradación (ceras, ligninas y otros polifenoles).

En general, de acuerdo con la clasificación de Morrison y Boyd (1985), los carbohidratos son compuestos químicos neutros que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno y tienen la fórmula empírica $(CH_2O)_n$, donde 'n' es tres o más. Sin embargo, algunos compuestos con propiedades de carbohidratos también contienen fósforo, nitrógeno o azufre. Los carbohidratos pueden contener en su estructura molecular grupos polihidroxialdehído, polihidroxicetonas, alcoholes y ácidos.

El término 'azúcar' se refiere generalmente a aquellos carbohidratos que contienen menos de 10 residuos de monosacáridos, mientras que el nombre 'oligosacáridos' (del griego *oligos*, pocos) es usado con frecuencia para incluir todos los carbohidratos que no son monosacáridos.

Los azúcares más simples son los monosacáridos, que se clasifican en triosas ($C_3H_6O_3$), tetrasas ($C_4H_8O_4$), pentosas ($C_5H_{10}O_5$), hexosas ($C_6H_{12}O_6$) y heptosas ($C_7H_{14}O_7$), dependiendo del número de átomos de carbono presentes en la molécula. Los monosacáridos pueden unirse, con la eliminación de una molécula de agua en cada enlace, para producir di-, tri-, tetra- o polisacáridos (Stick, 2001).

Los carbohidratos presentes en las células vegetales desempeñan cuatro papeles importantes: 1) como fuente de energía mediante su catabolismo, 2) en el aporte de átomos de carbono para la síntesis de otros componentes celulares (anabolismo), 3) constituyen la forma principal de almacenamiento de energía química, y 4) son elementos estructurales de la pared celular y de los tejidos (Mckee y Mckee, 2003).

Basado en el análisis de los carbohidratos presentes en desechos agrícolas, estos se pueden clasificar en cuatro fracciones importantes (Figura 2.1):

- a) Fracción soluble. Es una fracción compleja la cual se describe posteriormente.
- b) Fibra detergente neutro (FDN): representa la matriz insoluble de la pared celular en un detergente neutro. Esta compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa, lignina y sílice.
- c) Fibra detergente ácido (FDA): representa la fracción insoluble en un detergente ácido y esta compuesta básicamente por celulosa, lignina y sílice.
- d) Lignina detergente ácido (LDA): representa la fracción insoluble del residuo de la FDA, en ácido sulfúrico al 72%. Esta compuesta de lignina y sílice.

Pared Celular		
FDN		
Hemicelulosa	FDA	
	Celulosa	LDA
		Lignina

Figura 2.1. Composición de la pared celular vegetal y análisis que determina cada fracción

2.1.2.1 Fracción soluble

La fracción soluble es aquella que se solubiliza en agua y esta constituida por azúcares simples, sustancias nitrogenadas (aminoácidos), ácidos alifáticos, proteínas y cenizas, y puede contribuir del 5 - 30% en peso del tejido (esto dependiendo de la naturaleza del desecho). Los carbohidratos que no forman parte de la pared celular se denominan carbohidratos no estructurales. Son compuestos activos en el metabolismo de las plantas, se almacenan en órganos de reserva y están constituidos por azúcares libres (glucosa, fructosa, sacarosa y, en menor medida, maltosa, melobiosa, rafinosa y estaquiosa), almidón y fructano.

2.1.2.2 Componentes estructurales

Celulosa

La celulosa es el componente básico de los vegetales y consta de unidades de β -D-glucopiranosas unidas por enlaces β -1,4-glicosídicos (Ross, et al., 1991). La molécula de celulosa tiene regiones cristalinas alternadas con zonas amorfas. La insolubilidad de la celulosa y su alta resistencia mecánica se debe a la presencia de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares y a fuerzas de Van der Waals.

En todas las plantas superiores la celulosa aparece en forma de microfibrillas en las paredes primarias y secundarias (Figura 2.2 y 2.3), lo cual es el resultado de la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas, que se orientan en dominios cristalinos paralelos altamente ordenados y “salpicados” por regiones amorfas más desordenadas. El grado de cristalinidad de las microfibrillas de la celulosa depende de la fuente, la edad, y el pretratamiento del material vegetal del que provenga (Saxena y Brown, 2005).

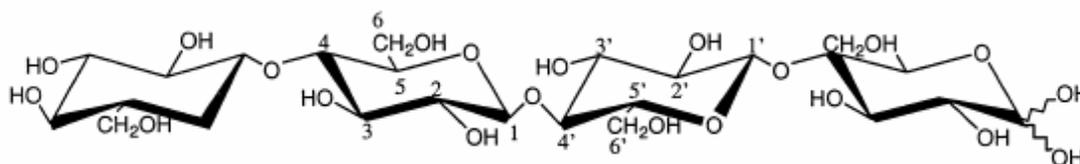


Figura 2.2. Esquema general de la molécula de celulosa (Dumitriu, 2005).

En la pared secundaria, la celulosa forma varias láminas en las cuales las microfibrillas se organizan en paralelo, presentando una orientación diferente en cada lámina (Lynd, et al., 2002), lo cual es conocido como concepto helicoidal. Este arreglo helicoidal puede tener implicaciones importantes con relación a los procesos de degradación de las enzimas microbianas. Las microfibrillas generalmente están empotradas en una matriz de hemicelulosa y lignina.

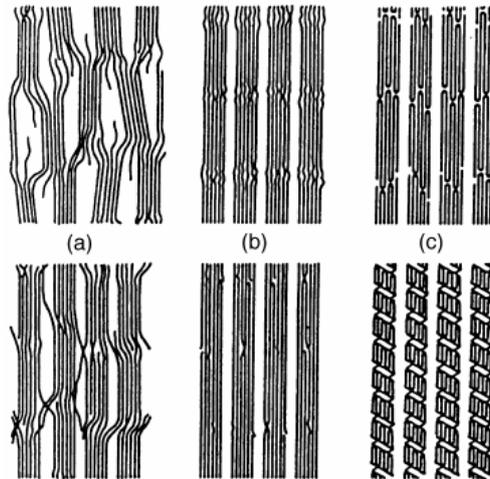


Figura 2.3. Estructura de las microfibrillas de celulosa: (a) baja cristalinidad; (b) alta cristalinidad; (c) modelos plegados (Dumitriu, 2005).

Hemicelulosa

La hemicelulosa es un heteropolisacárido de la pared celular de los tejidos vegetales. Su función es de soporte o de almacenamiento de agua en la planta. Es el segundo polisacárido estructural más abundante de las plantas. Está presente en asociación con la celulosa en las paredes de la mayoría de las especies vegetales, y puede ser extraída por álcalis. En la Figura 2.4 se muestran como están compuestas las unidades estructurales; principalmente se componen de D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-xilosa y L-arabinosa unidas en diferentes combinaciones y por varios enlaces glicosídicos (Anderson y Krznarich, 1935). Todas las hemicelulosas contienen grupos ácidos α -D-4-O-metilglucorónicos y algunas unidades de acetilo. En base a los principales residuos de azúcares presentes en el esqueleto del polímero, las hemicelulosas pueden ser denominadas xilanos, glucomananos, galactanos o arabinanos. Se considera generalmente que los dos tipos principales de hemicelulosas son los xilanos y los glucomananos (Figura 2.4 a y b).

Las hemicelulosas contienen dos tipos diferentes de polisacáridos: cadena corta (o celulosanas), que forman parte de la propia estructura de la celulosa y están orientadas en la estructura micelar, y amorfas que se asocian íntimamente con la lignina de la membrana celular y pueden ser hidrolizadas a xilosa, manosa, galactosa y glucosa y por medio de un tratamiento térmico se

pueden formar derivados del furano (Palmqvist y Hägerdal, 2000). Estos polisacáridos forman junto con la lignina la matriz en la cual se incrustan las fibrillas de celulosa que constituyen la mayor parte de la pared secundaria de las células vegetales.

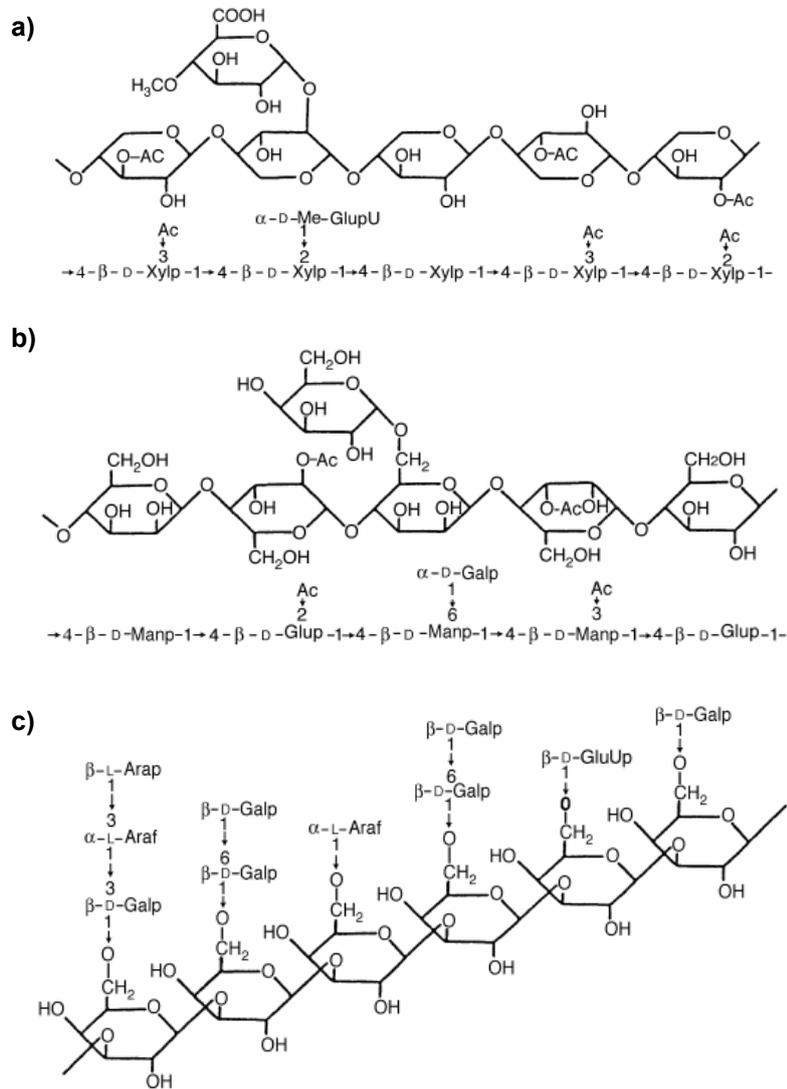


Figura 2.4. Estructura de la hemicelulosa: a) Segmento de xilano; b) segmento de glucomanano; c) segmento de arabinogalactano (Dumitriu, 2005).

Las celulosanas pueden consistir en pentosanas y hexosanas. La celulosana más común es el xilano, un polisacárido que aparece en casi todas las plantas y que es insoluble en agua, soluble en solución alcalina, se hidroliza con facilidad y levógiro. Este polisacárido contiene grupos ácidos de α -D-O-metil glucorónico y grupos acetilos en su estructura molecular, lo cual no permite que se de la formación de fibrillas perfectamente ensambladas. Tanto por su

distribución botánica como por su papel estructural, el xilano se clasifica en tercer lugar de importancia, después de la celulosa y el almidón, abundando en los cultivos anuales, particularmente en desechos agrícolas como tallos de maíz (*Zea mays*), vainas y pajas de cereales, pudiendo representar del 15 al 30 % de los residuos. Aparentemente, el xilano aparece enredado en la fibra de celulosa aunque no es un componente de la región micelar cristalina.

Lignina y compuestos fenólicos

La lignina, que no es un carbohidrato pero que está estrechamente asociada a los compuestos de este grupo, confiere resistencia química y biológica a la pared celular y fortaleza mecánica a la planta. El término 'lignina' no se refiere a un compuesto simple, bien definido, sino que es un término colectivo que engloba a una serie de compuestos estrechamente relacionados. La lignina representa el principal compuesto fenólico de la pared celular (Kirk y Farrell, 1987).

Se considera un polímero que se origina de tres derivados de fenilpropano: alcohol coumarilo, alcohol coniferilo y alcohol sinapilo. La molécula de lignina se conforma de muchas unidades fenilpropanoides asociadas en una estructura compleja entrelazada (Figura 2.5). La complejidad resulta del gran número de diferentes enlaces que unen a los monómeros. Las diferencias en la composición de la lignina se manifiestan en el contenido de grupos metoxi. (Boerjan, et al., 2003)

Es un polímero con estructura no definida y existe una gran heterogeneidad entre las ligninas de diferentes especies, órganos, tejidos y posiblemente de tipo de células (Boerjan, et al., 2003). Las ligninas han sido clasificadas en ligninas nuclear o central y lignina no nuclear (Kremers, 1959). Este compuesto es de particular interés en nutrición animal debido a su alta resistencia a la degradación química.

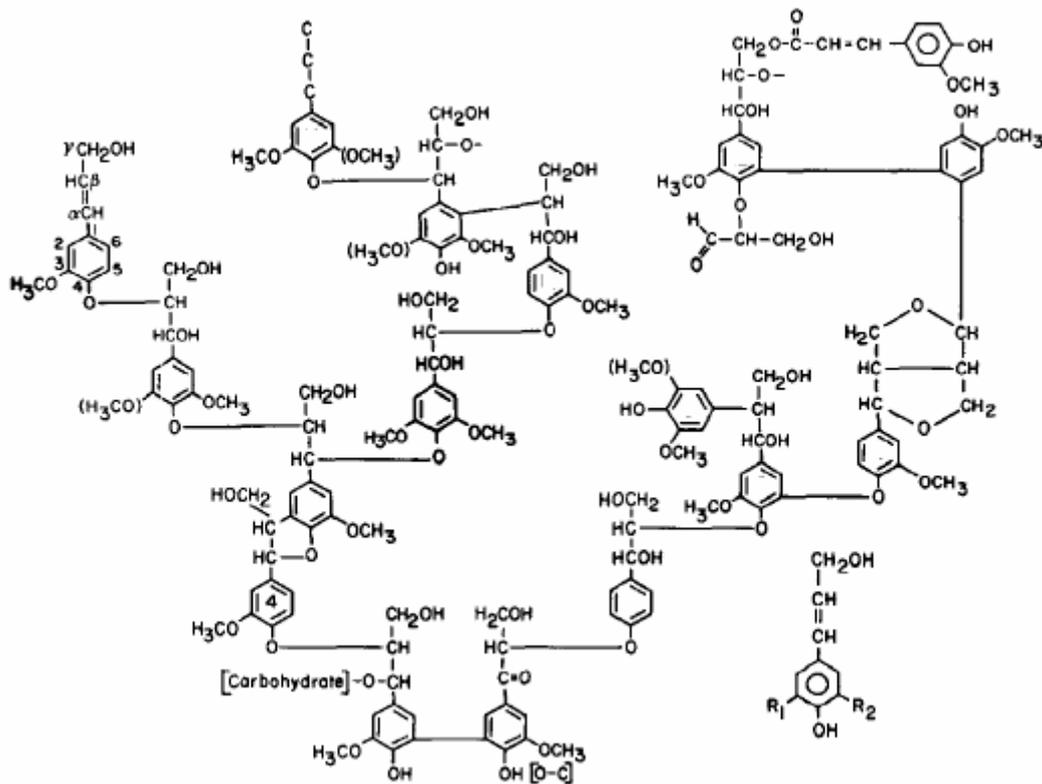


Figura 2.5. Esquema general de la molécula de lignina (Kira y Farrell, 1987)

La lignina nuclear representa el principal polímero de lignina, y consiste en un polímero fenilpropanoide altamente condensado (Kremers, 1959). Para estimar las concentraciones de lignina, se consideran los métodos Klason y las determinaciones de la lignina ácido detergente (LAD) (en ácido sulfúrico al 72%).

En cambio, la lignina no nuclear o central consiste en fenoles de bajo peso molecular (por ejemplo: p-coumárico, ácido ferúlico, y sus dímeros) que pueden ser extraídos mediante una hidrólisis ligera. Los ácidos fenólicos esterificados son estimados por extracción alcalina a bajas temperaturas, mientras que los ácidos fenólicos eterificados se estiman mediante hidrólisis alcalina a altas temperaturas o hidrólisis ácida. Estos ácidos fenólicos pueden estar ligados a la lignina nuclear, a los polisacáridos, o a ambos en la pared celular de las plantas (Kremers, 1959).

Los compuestos fenólicos de la pared celular han sido considerados como el principal factor limitante de la biodisponibilidad tanto del material de la pared como de los materiales presentes en el contenido celular.

2.1.3 Degradación biológica de los principales componentes de los desechos agrícolas

2.1.3.1 Degradación de celulosa

La celulosa es uno de los componentes más abundantes de la biomasa vegetal que es degradada por una serie de microorganismos mediante la acción de varias enzimas. En el caso de los hongos filamentosos y en algunos actinomicetos las enzimas no están asociadas en complejos, mientras que en el género *Clostridia* forman un complejo denominado “celulosoma”.

La degradación biológica de la celulosa (Figura 2.6) es catalizada por un sistema constituido por tres enzimas (Ladisich, et al., 1983):

- Las endo-1,4- β -glucanasas rompen los enlaces glicosídicos β -1,4 en las regiones amorfas internas de la macromolécula dando largos fragmentos solubles (oligosacáridos).
- Las exo-1,4- β -glucanasas, también llamadas celobiohidrolasas, actúan sobre los oligosacáridos cortando desde los extremos de la molécula (extremos no reductores) y originando el disacárido celobiosa como principal producto.
- Las β -glucosidasas hidrolizan el enlace éster del disacárido celobiosa para formar glucosa.

La celulosa intacta se hidroliza completamente cuando estas tres enzimas operan coordinadamente, como ocurre en el celulosoma de *Clostridium thermocellum* que se localiza en la superficie de la célula (Levin, et al., 2006).

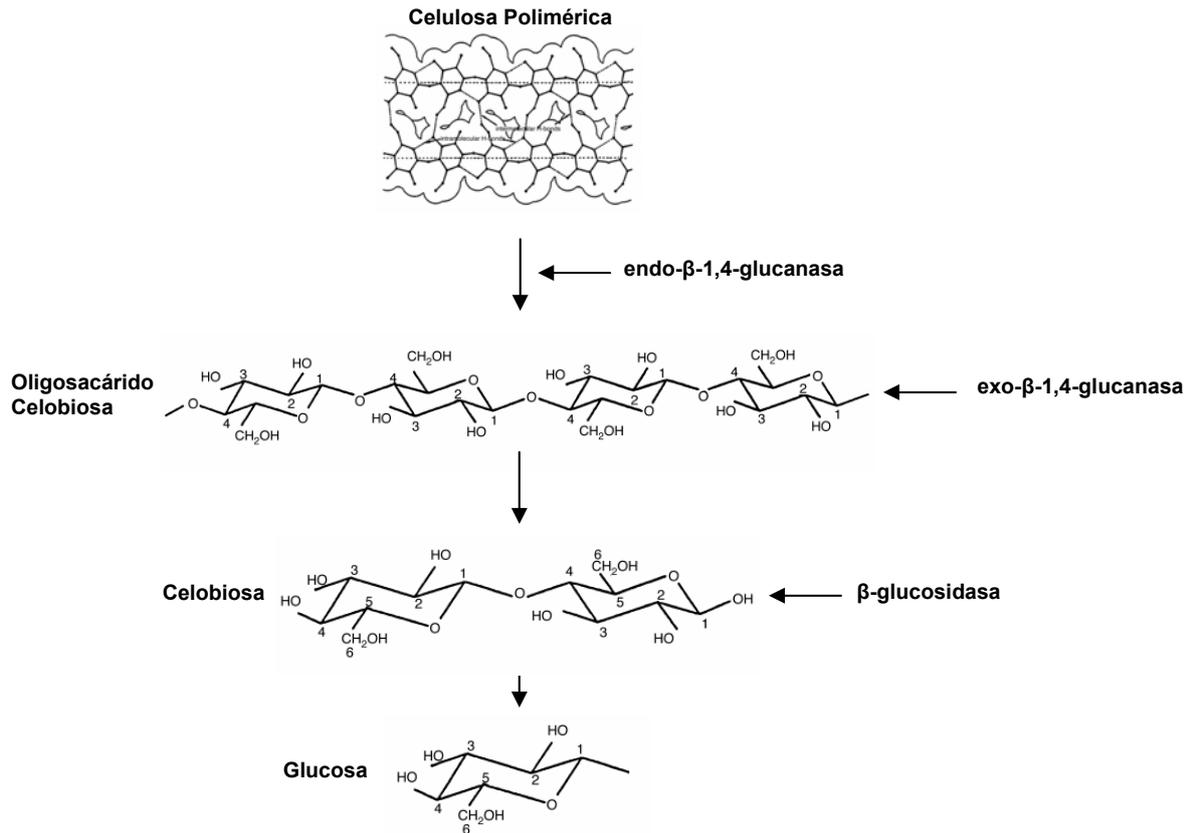


Figura 2.6. Esquema general de la degradación de la celulosa (modificada de Dumitriu, 2005).

2.1.3.2 Degradación de hemicelulosa

Como ya se mencionó, el xilano es el polisacárido más abundante después de la celulosa. La cadena consta de 30 - 100 unidades de β-D-xilopiranososa con enlaces 1,4 -glicosídicos. El xilano es degradado más rápidamente que la celulosa. La xilanasa que es constitutiva en algunos clostridios e inducible en otros organismos, produce xilosa y xilobiosa la cual consiste en oligómeros de 2 a 6 unidades. La degradación de las hemicelulosas está determinada por la disponibilidad de nitrógeno como ocurre con la descomposición de la celulosa (Coen y Dehority, 1970; Norman, 1941).

2.1.3.3 Degradación de lignina

Como ya se mencionó, la lignina es el segundo elemento en importancia de la pared vegetal. La lignina es un producto final inerte del metabolismo vegetal y solamente es degradada por microorganismos lignocelulolíticos (Kirk y Farrell, 1987; Kremers, 1959)

La degradación de lignina ocurre en presencia de oxígeno y glucosa. El sistema enzimático contiene peroxidasas que catalizan la ruptura oxidativa de los enlaces β -O-4 éter y los C-C de la lignina y requieren H_2O_2 proveniente de la oxidación de la glucosa por la glucosa-oxidasa. La formación de peroxidasas es promovida por la limitación de nitrógeno y la descomposición de la lignina parece tener como principal objetivo el acceso a los componentes nitrogenados de la madera. En un paso posterior, las fenoloxidasas actúan sobre los compuestos fenólicos de bajo peso molecular liberados (Boerjan, et al., 2003; Kirk, 1971).

2.2 Mecanismos de la producción de hidrógeno

La producción de hidrógeno a partir de biomasa, se puede llevar a cabo por procesos termoquímicos y biológicos. Los procesos termoquímicos incluyen a la combustión, la pirólisis y la gasificación. Por otra parte, los procesos biológicos incluyen a la biofotólisis (directa e indirecta), la fotofermentación y la fermentación (Ren et al., 2006). El presente trabajo se enfoca a la utilización de la fermentación para la producción de hidrógeno a partir de residuos agrícolas

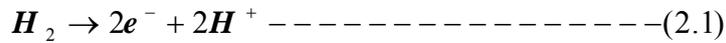
2.2.1 Aspectos generales de la producción biológica de hidrógeno

Todos los procesos biológicos de producción de hidrógeno son controlados por enzimas productoras de hidrógeno, tales como las nitrogenasas y las hidrogenasas (Fe-hidrogenasas, NiFe-Hidrogenasa). La presencia de estas enzimas va a depender del tipo de microorganismo y proceso que se este empleando para llevar a cabo la producción de hidrógeno. (Hallenbeck y Benemann, 2002).

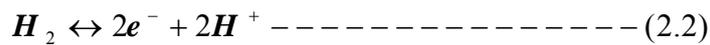
Hallenbeck y Benemann (2002) mencionan que las nitrogenasas presentan una baja replicación, requieren grandes cantidades de energía para llevara acabo su biosíntesis y además, necesitan ATP para llevar a cabo la catálisis, por ello, estas enzimas no son una vía metabólica efectiva para la producción de hidrógeno.

Por otra parte, las hidrogenasas se pueden clasificar en dos categorías: hidrogenasas consumidoras de hidrógeno e hidrogenasas reversibles. Las

hidrogenasas consumidoras de hidrógeno, tales como las NiFe hidrogenasas y las NiFeSe hidrogenasas, actúan como catalizadores importantes en el consumo de hidrogeno tal como se muestra en la siguiente reacción:



Las hidrogenasas reversibles, según indicado por su nombre, tienen la capacidad de producir y consumir hidrógeno dependiendo de la condición de la reacción:



Por lo tanto, estas enzimas funcionan para remover el exceso de equivalentes reductores durante el proceso de la fermentación, llevado a cabo por bacterias anaerobias.

2.3 Fermentación

La fermentación es un proceso biológico degradativo en el cual parte de los materiales orgánicos de un substrato son convertidos en gas, mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono, por un consorcio de bacterias que son sensibles o completamente inhibidas por el oxígeno. Este proceso comprende dos etapas: hidrólisis y acidogénesis.

2.3.1 Hidrólisis

La materia orgánica polimérica no puede ser utilizada directamente por los microorganismos a menos que se hidrolicen en compuestos solubles, que puedan atravesar la membrana celular. La hidrólisis es, por tanto, el primer paso necesario para la degradación anaerobia de substratos orgánicos complejos. La hidrólisis de estos materiales orgánicos complejos es llevada a cabo por enzimas extracelulares excretadas por las bacterias fermentativas. La etapa hidrolítica puede ser la etapa limitante de la velocidad del proceso global, sobre todo tratando desechos con alto contenido en sólidos (Jördening y Winter, 2005). La materia orgánica puede estar compuesta de tres tipos básicos de macromoléculas: carbohidratos, proteínas y lípidos. La hidrólisis de cada tipo de compuesto se realiza por diferentes grupos enzimáticos.

Los principales productos de la hidrólisis de la celulosa son celobiosa y glucosa, mientras que la hemicelulosa produce pentosas, hexosas y ácidos urónicos. Las proteínas son hidrolizadas por proteasas en proteosomas, peptonas, péptidos y aminoácidos. Hay proteasas extracelulares, conocidas como proteinasas que atacan la proteína entera, y las peptidasas intracelulares, que cortan aminoácidos del extremo de proteínas y péptidos. Los aminoácidos producidos son degradados a ácidos grasos volátiles, dióxido de carbono, hidrógeno, amonio y sulfuro. Generalmente la tasa de hidrólisis de proteínas es menor que la de los carbohidratos (Jördening y Winter, 2005; Gerardi, 2003). La degradación de lípidos en ambientes anaerobios consiste en una ruptura inicial de las grasas por un grupo de enzimas hidrolíticas (lipasas) en los correspondientes ácidos grasos de cadena larga y moléculas de glicerol. Una molécula de fosfolípidos produce un equivalente de ácido fosfórico, uno de glicerol y dos de ácidos grasos.

El grado de hidrólisis y la velocidad del proceso depende de muchos factores, entre otros del pH, temperatura, de si la materia orgánica es soluble o particulada, de la composición de la materia orgánica (Jördening y Winter, 2005) y del tamaño de partícula (Gerardi, 2003).

La tasa de hidrólisis, en general, aumenta con la temperatura independientemente del compuesto de que se trate. La tasa de hidrólisis depende también del tamaño de las partículas, debido fundamentalmente a la disponibilidad de superficie para la adsorción de las enzimas hidrolíticas.

2.3.2 Acidogénesis

Las moléculas orgánicas solubles son fermentadas por varios organismos fermentativos formando compuestos que pueden ser utilizados directamente por los microorganismos metanogénicos (acético, fórmico, H₂) y compuestos orgánicos más reducidos (láctico, etanol, propiónico, butírico, principalmente) que tienen que ser oxidados por bacterias acetogénicas a substratos que puedan utilizar los metanogénos (Gerardi, 2003). Las proporciones entre los productos de la fermentación varían en función del consumo de H₂ por parte de los microorganismos que utilizan hidrógeno. Cuando el H₂ es eliminado de

forma eficiente las bacterias fermentativas no producen compuestos reducidos como el etanol, favoreciendo la producción de H₂ y la liberación de energía en forma de ATP (Jördening y Winter, 2005). La actividad de algunas bacterias fermentativas y acetogénicas depende de la concentración de H₂, siendo posible sólo a valores muy bajos de presión parcial de H₂. La eliminación continua de H₂ mediante oxidación por CO₂ (metanogénos hidrogenotróficos) estimula la acción de las bacterias fermentativas, al eliminar un producto de la reacción (Boone y Xun, 1987).

2.3.3 Microbiología de la producción de hidrógeno

La producción de hidrógeno por medio de la fermentación se puede dividir en tres grupos: 1) estrictamente anaerobios, 2) anaerobios facultativos y 3) cultivos mixtos (Tabla 2.1). Las bacterias estrictamente anaerobias incluyen entre otras a *Clostridium butyricum*, *C. welchii*, *C. pasteurianum*, *C. beijerincki*, *Citrobacter sp.*, (Nath y Das, 2004). Los microorganismos facultativos como los *Bacillus* y los *Enterobacter* generan hidrógeno por medio de la piruvato-formiato liasa y de hidrogenasas. Los cultivos mixtos productores de hidrógeno, enriquecidos de ambientes naturales también se han reportado (Lay, 2000). La producción de hidrógeno a partir de especies de *Clostridium* es generalmente más alta que la producción de las bacterias anaerobias facultativas como el *Enterobacter sp* (Yokoi et al., 1998).

Tabla 2.1. Microorganismos anaerobios reportados para la producción de hidrógeno

Clasificación	Microorganismo	Sustrato	HY ^a	Referencia
anaerobios estrictos	(I) <i>Clostridium saccharoperbutylacetonium</i> ATCC 27021	Suero de queso	2.7	Ferchichi et al., 2005
	(II) <i>C. paraputrificum</i> M-21	Glc. NAc ^b	2.5	Evyernie et al., 2001
	(III) <i>C. butyricum</i> CGS5	Sacarosa	2.78	Chen, et al., 2005
	(IV) <i>Citrobacter sp.</i> Y 19	Glucosa	2.49	Oh et al., 2003a
Anaerobios Facultativos	(I) <i>Escherichia coli</i>	Glucosa	2	Bisaillon, et al., 2006
	(II) <i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT-08	Glucosa	2.2	Kumar y Das, 2000
	(III) <i>E. cloacae</i> DM 11	Glucosa	3.8	Kumar et al., 2001
	(IV) <i>Enterobacter sp.</i> BY-29	Xilosa	1.35	Yokoi, et al., 2001
	(V) <i>Enterobacter sp.</i> BY-29	Glucosa	1.10	Yokoi, et al., 2001
Cultivos mixtos	(I) Composta de lodo	Agua residual	2.5	Lay et al., 2001
	(II) Lodo anaerobio	Sacarosa	3.4	Mu al., 2006a
	(III) Sedimento de lago	Glucosa	1.4	Kawagoshi et al., 2005
	(IV) Lodo residual	Sacarosa	3.43	Lin y Lay, 2005
	(V) Suelo	Glucosa	0.92	Logan et al., 2002

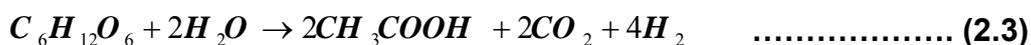
a. Rendimiento de Hidrógeno (mol H₂/ mol sustrato); b. N-acetil-D-Glucosamina

Por otra parte, algunos microorganismos anaerobios pueden producir hidrógeno a partir de carbohidratos presentes en desechos agrícolas. Por ejemplo, los organismos que pertenecen al genero *Clostridium* tales como *C. butyricum* (Yokoi, et al., 2001), *C. thermolacticum* (Collet, et al., 2004), *C. pasteurianum* (Liu y Shen, 2004; Lin y Lay, 2004), *C. paraputrificum* M-21 (Evyernie, et al., 2001) y *C. bifermentans* (Wang, et al., 2003) son organismos estrictamente anaerobios y formadores de esporas. La clase Clostridia produce hidrógeno durante la fase exponencial del crecimiento. Cuando se lleva a cabo el crecimiento en lote el metabolismo cambia a partir de una fase de producción de hidrógeno/ácido a una fase de producción solventogénica, cuando la población de microorganismos alcanza la fase estacionaria del crecimiento. La

especie dominante de Clostridia puede ser obtenida fácilmente por un tratamiento térmico de lodo residual, lodo anaerobio, suelo y compostas. Las esporas que sobreviven a altas temperaturas pueden ser activadas cuando se proporcionan las condiciones ambientales adecuadas para la producción de hidrógeno. Investigaciones en la diversidad microbiana presente en un lodo mesofílico productor de hidrógeno indicaron la presencia de la especie Clostridia en un 64.6% (Fang y Liu, 2002).

2.3.4 Sustratos empleados para la producción de hidrógeno

La glucosa es esencialmente una fuente de carbono fácilmente biodegradable, presente en diferentes tipos de efluentes industriales. También esta presente en diversos desechos agrícolas y es la hexosa más estudiada como fuente de carbono para la producción anaerobia de hidrógeno (Lin y Chang, 1999; Fang y Liu, 2002; Kawagoshi, et al., 2005). La estequiometría de la formación de hidrógeno a partir de glucosa bajo condiciones anaerobias, es descrita por las siguientes ecuaciones (Morimoto et al., 2004):



Dada la formula molecular de la glucosa, la conversión teórica total de 1 mol de glucosa produciría 12 moles de hidrógeno. Sin embargo, en base a la estequiometría indicada en las ecuaciones anteriores, el rendimiento máximo teórico para la producción de hidrógeno es de 4 mol H₂/mol glucosa_{removida} cuando se da la formación de acetato (ecuación 2.3) y de 2 mol H₂/mol glucosa_{removida} cuando se da la producción de butirato (ecuación 2.4) como subproductos del metabolismo de la fermentación (Kim, et al., 2006).

El rendimiento más alto reportado para la producción de hidrógeno a partir de glucosa es alrededor de 2.0 a 2.4 mol H₂/mol glucosa (Ueno, et al., 2001; Fang y Liu, 2002; Morimoto, et al., 2004). Una de las razones del bajo rendimiento es la obtención de una mayor cantidad de butirato con respecto a la de acetato. Fang y Liu (2002) sugieren que la biodegradación parcial de la glucosa podría ser otra razón por la cual se obtiene un rendimiento bajo. Sin embargo, aún

cuando la glucosa se degradada en un 95%, se han observado rendimientos menores a 1.7 mol H₂/mol glucosa (Lin y Chang, 2004). Lo anterior sugiere, que una fracción importante del sustrato se emplea para el crecimiento bacteriano o la producción de metabolitos. Esta es otra razón por lo que se observan bajos rendimientos.

La xilosa es un monosacárido de cinco átomos de carbono que se encuentra ampliamente distribuida en la biomasa vegetal y que puede ser utilizada para la producción de hidrógeno. Lin y Cheng (2006) reportaron la producción de hidrogeno a partir de xilosa utilizando como inóculo cultivos mixtos. El porcentaje del contenido de hidrógeno fue del 32% v/v en un sistema continuo. Lin, et al., (2006) reportaron rendimientos (mol H₂/mol xilosa) para cuatro diferentes tipos de inóculos: 1.17, 0.96, 0.33 y 0.55 para lodo residual, lodo de destilería, lodo de tratamiento de residuos de comida y lodo del procesamiento de papel, respectivamente.

La producción de hidrógeno a partir de sacarosa ha sido ampliamente estudiada en lote y en sistemas continuos (Khanal, et al., 2004; Lin y Chang, 2004; Chen, et al., 2001; Chang y Lin, 2004).

En lo que se refiere a sustratos complejos el almidón contenido en los materiales de deshecho es abundante en la naturaleza y tiene un gran potencial para ser utilizado como fuente de carbohidratos para la producción de hidrógeno (Liu y Shen, 2004; Lay, 2000). Por otro lado, la celulosa es el mayor constituyente de la biomasa de las plantas y esta altamente disponible en desechos agrícolas, como por ejemplo trigo (Fan, et al., 2006) y maíz (Datar, et al 2007), así como también, en efluentes industriales, tales como los de la pulpa del papel y de la industria alimenticia.

Los desechos de industrias alimenticias constituyen una fracción importante de la basura sólida municipal. Los rellenos sanitarios, el compostaje y la incineración son las disposiciones finales que tienen estos desechos. Sin embargo, el alto contenido de carbohidratos en forma de azúcares simples, almidón y de celulosa hace que estos desechos sean potencialmente

adecuados para la producción biológica de hidrógeno. El problema con estos desechos es la gran variabilidad en la composición de ellos, ya que esto requiere ajustar constantemente las condiciones de operación de los procesos de producción de hidrógeno. Algunos desechos de alimentos que se han utilizado son la fracción orgánica de los residuos municipales (Lay et al., 1999), residuos de manzana, residuos de la industria de la papa (Van Ginkel, et al., 2005), residuos de guanábana (Vijayaraghavan, et al 2006) entre otros.

2.4 Rutas metabólicas en la producción de hidrógeno

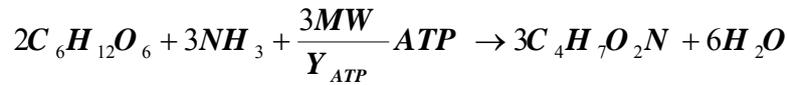
Normalmente las fermentaciones microbianas se clasifican según sus productos finales, los principales productos de los procesos de fermentación asociados a la producción de hidrógeno son acetato, butirato, propionato y algunos alcoholes.

2.4.1 Partición de equivalentes reductores

Clostridium butyricum, es una bacteria anaerobia estricta, que es conocida como un productor clásico de ácidos orgánicos y que generalmente fermenta carbohidratos a butirato, acetato, dióxido de carbono e hidrógeno (Andaloussi, et al., 1998). El acetato y el butirato son los productos principales, cuando el NADH_2 y el ATP son generados en el proceso (Chen, et al., 2006a). Existen dos rutas para la producción de hidrógeno, según se muestran en la Figura 2.7. Una es la división de la molécula de piruvato a acetyl-CoA, CO_2 e H_2 , que es catalizada por la piruvato: ferridoxina oxidoreductasa (PFOR) (Chen, et al., 2006b). En la segunda ruta el NADH_2 formado durante la transformación de glucosa a piruvato es utilizado para producir hidrógeno por la hidrogenasa (Deckwer, 1995). Las dos rutas tienen en común que los electrones que se derivan de la oxidación del sustrato, son transferidos por la hidrogenasa a la ferridoxina y al H^+ para la producción de hidrógeno. En conclusión, el hidrógeno producido por las bacterias anaerobias estrictas es producido principalmente por las hidrogenasas.

Otro producto del metabolismo de la glucosa por *Clostridium butyricum* bajo condiciones anaerobias es la biomasa. La formación de biomasa se puede

expresar estequiométricamente como se muestra a continuación (Chen, et al., 2006b):



$C_4H_7O_2N$ denota la composición elemental de la biomasa, correspondiendo al peso molecular de 101 g/mol, Y_{ATP} es la producción energética de la biomasa, la cual se encuentra cerca de los 8.5 g de biomasa por mol de ATP en cultivos de *Clostridium butyricum*. Por simplicidad Y_{ATP} se considera igual a 8.6 g/mol, quedando la ecuación de la manera siguiente (Chen, et al., 2006b):

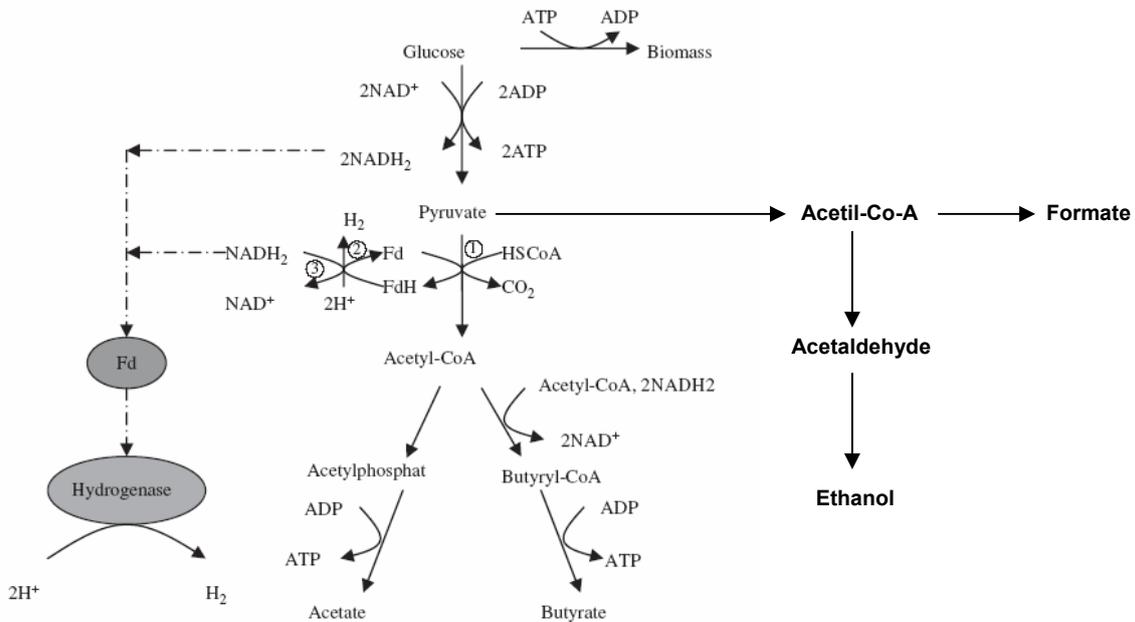
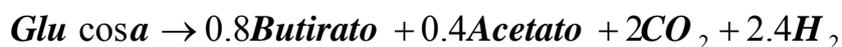


Figura 2.7. Ruta metabólica de producción de hidrógeno, acetato y butirato a partir de glucosa por medio de *Clostridium butyricum* bajo condiciones anaerobias. La esquematización de la producción de etanol y formiato corresponden a otros organismos fermentativos (algunos Clostridios, Enterobacterias y bacterias heterolácticas). 1. Piruvato: Ferridoxina oxidoreductasa (PFOR); 2. Hidrogenasa; 3. NADH: ferridoxina oxidoreductasa. (Modificada de Chen, et al., 2006b)

2.4.2 Fermentación de acetato y butirato

Existen microorganismos del género Clostridia que producen hidrógeno durante la fermentación de la glucosa a butirato y acetato (Figura 2.11) de acuerdo a la siguiente estequiometría (Dumitru, 2005):



En la Figura 2.8 se puede observar que un mol de glucosa es transformado a dos moles de piruvato, generándose dos moles de ATP y dos moles de piruvato. El piruvato es descarboxilado y convertido a acetyl CoA por la piruvato ferridoxina oxidoreductasa. Además dos moles del NAD^+ oxidados, son reducidos durante esta reacción ($2 \text{NADH} + \text{H}$), los cuales finalmente proporcionan los equivalentes reductores para la síntesis de dos moles de hidrógeno. Se ha reportado que si el pH del medio alcanza un valor de 4 a 6 la cantidad de butírico es mayor que la de acético, mientras que si el pH está entre 6.5 y 7 las cantidades de acético y butírico son semejantes (Fang et al. 2002) Por otra parte también se ha reportado que si la presión parcial de hidrógeno es menor a 60 Pa se favorece la formación de acetato sobre la de butirato (Angenent, et al., 2004). Estas observaciones pudieran indicar que la preferencia hacia la formación de acetato o butirato está influenciada por estos parámetros. Una posibilidad es que la reacción puede proceder hacia la formación de acetato o butirato debido a una mayor actividad de las enzimas fosfoacetilasa y fosfobutirilasa en valores de pH de 6 y 5 respectivamente. Aunque el paso limitante para la formación de butirato podría estar en la reacción del acetyl-CoA a acetoacetyl-CoA catalizada por la enzima Acetyl-CoA-acetyltransferasa o en la reacción del butiril-CoA a butirilfosfato catalizada por la fosfobutirilasa (Zhu y Yang, 2004).

Cabe aclarar que cuando la formación de acetato se ve favorecida los equivalentes reductores empleados en la formación de butiril-CoA se emplean en la producción de 2 moles adicionales de hidrógeno, los cuales no se muestran en la Figura 2.8

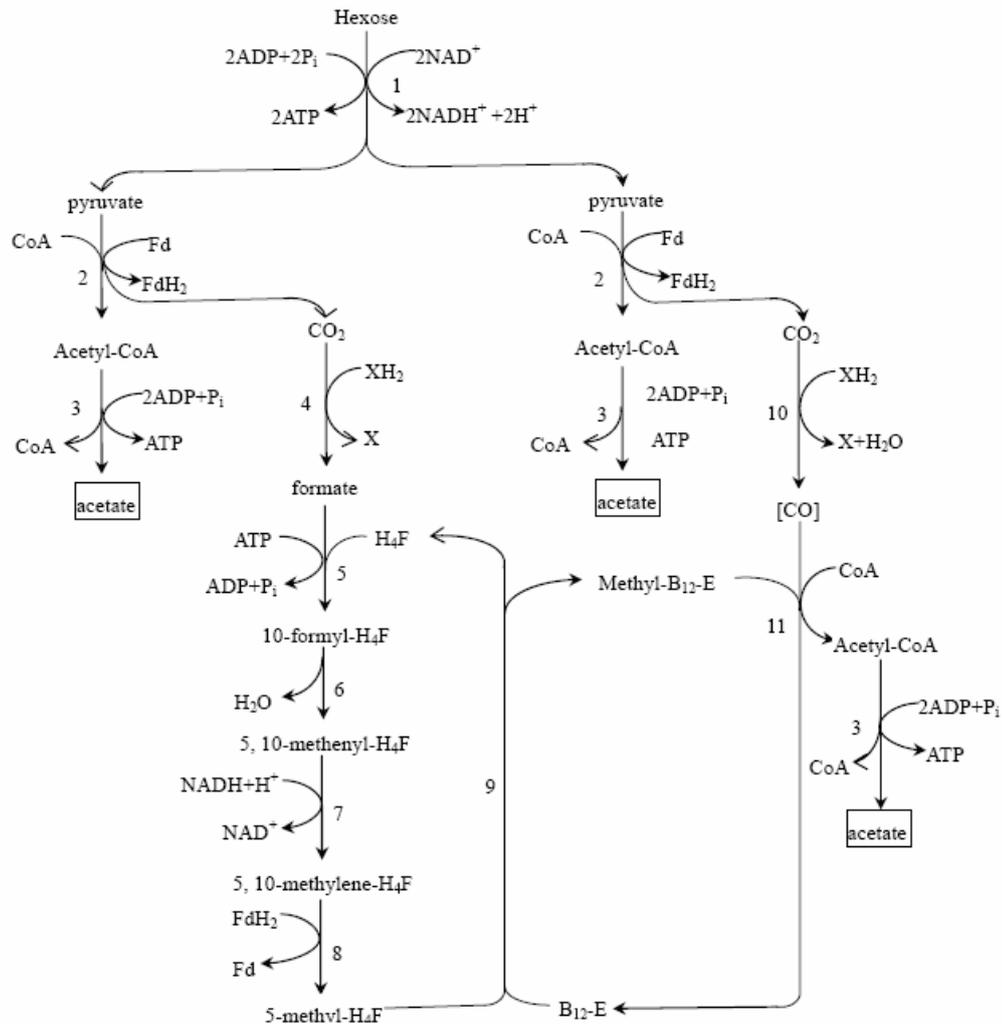


Figura 2.9. Ruta metabólica de la fermentación de acetato a partir de glucosa por *C. aceticum*: 1. Degradación de la hexosa por medio de la ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas; 2. Piruvato-Ferridoxina oxidoreductasa; 3. Fosfatotransacetil acetato quinasa; 4. Formato deshidrogenasa; 5. Fromil-tetrahidroftalato sintetasa; 6. Metil-tetrahidroftalato ciclohidrolasa; 7. Metileno-tetrahidroftalato dehidrogenasa; 8. Metileno-tetrahidroftalato reductasa; 9. Tetrahidroftalato: B₁₂ metiltransferasa; 10. Co-deshidrogenasa; 11. Acetil-CoA (Zeikus, 1980).

2.4.3 Fermentación de propionato

La formación de propionato a partir de glucosa esta acompañada por la formación de acetato y CO₂. La Figura 2.10 muestra que en *Propionibacterium acidipropionici* el piruvato es un intermediario común en la ruta metabólica que va de glucosa a propianato (Campos y de la Torre, 2002). En dicha figura se puede observar que la formación de un mol de ácido propiónico consume en forma neta dos moles de NADH₂, equivalente a dos moles de hidrógeno. Así mismo se puede observar que hay una formación neta de dos moles de ATP.

Cabe aclarar que *P. acidipropionici* produce ácido propiónico no solo a partir de glucosa sino también a partir de lactato. Este tipo de fermentación también tiene un impacto directo en los rendimientos de producción de hidrógeno, ya que la glucosa consumida se emplea en la formación de ácido propiónico sin que se presente la producción de hidrógeno.

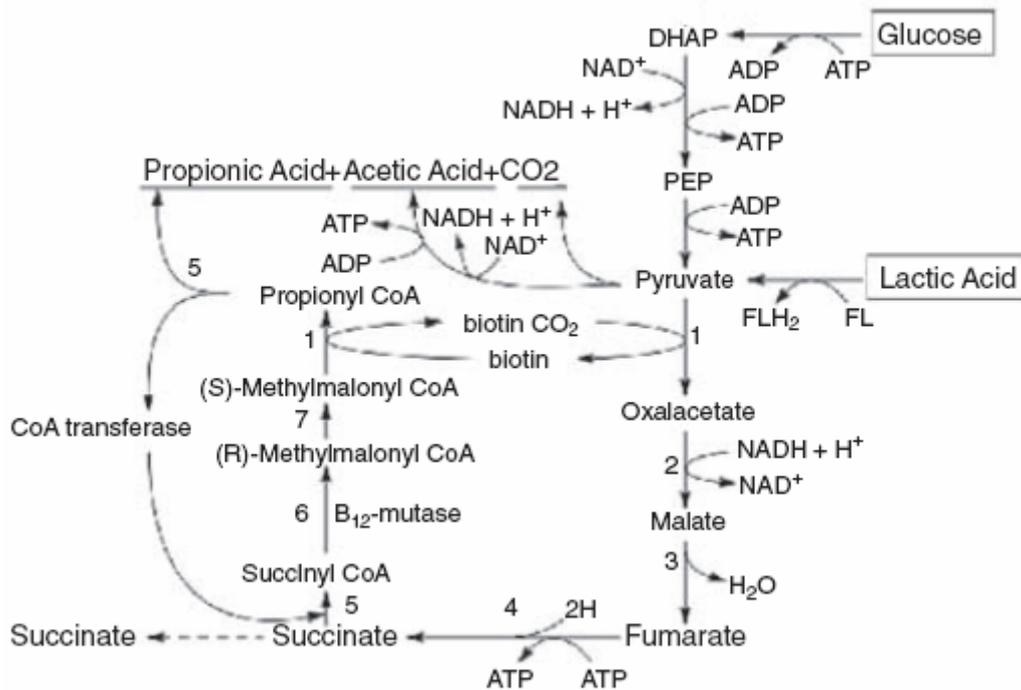


Figura 2.10. Ruta metabólica de la fermentación de glucosa y ácido láctico por Propionobacteria. 1. (S)-metilmalonil-CoA-piruvato transcarboxilasa; 2. Malato deshidrogenasa; 3. Fumarasa; 4. Fumarato reductasa; 5. CoA-transferasa; 6. (R)-metilmalonil-CoA mutasa y 7. metilmalonil-CoA racemasa (Dworkin, et al., 2006).

En cuanto a los factores claves reportados en la literatura sobre la desviación de la ruta metabólica hacia la formación de este metabolito, solo se ha mencionado que la fuente de nitrógeno es un factor importante en la producción de propianato (Dworkin, et al., 2006).

2.4.4 Fermentación solventogenesis

Algunas especies bacterianas llevan a cabo la fermentación alcohólica y se desarrollan en sistemas anaerobios (Dworkin, et al., 2006). Existen dos rutas metabólicas principales para que se lleve a cabo la fermentación alcohólica. La ruta Entner-Doudoroff (Figura 2.11) y la de Embden-Meyerhoff-Parnas (Figura

2.12). La diferencia que se tiene en estas dos rutas es que en la primera ruta se forma ácido keto-3-deoxi-6-fosfogluconico a diferencia de la segunda ruta que se forma fructosa-1,6-difosfato, en la transformación de glucosa-6-P hacia fosfotriosa. Cabe mencionar que también en la primera ruta junto con el ácido keto-3-deoxi-6-fosfogluconico se forma una molécula de ácido pirúvico, después el ácido pirúvico sufre una descarboxilación (debido a la intervención de la piruvato descarboxilasa) para formar acetaldehído y finalmente etanol (Figura 2.11). En la segunda ruta además de producirse etanol vía acetyl-CoA se producen cantidades considerables de acetato y lactato (Figura 2.12). Este tipo de fermentaciones también afecta el rendimiento de hidrógeno ya que en una de ellas (vía Entner-Doudoroff) no se produce hidrógeno, pero se consume glucosa. En la fermentación vía Embden-Meyerhoff-Parnas, por el contrario se produce hidrógeno, aunque con una estequiometría de un mol de hidrógeno por mol de glucosa.

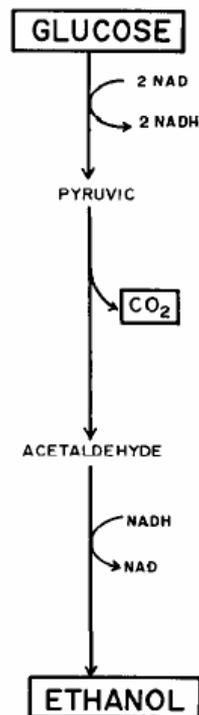


Figura 2.11. Fermentación de etanol a partir de glucosa por medio de la ruta de Entner-Doudoroff presente en Levaduras, Acetobacterias y Zimomonas (Zeikus, 1980)

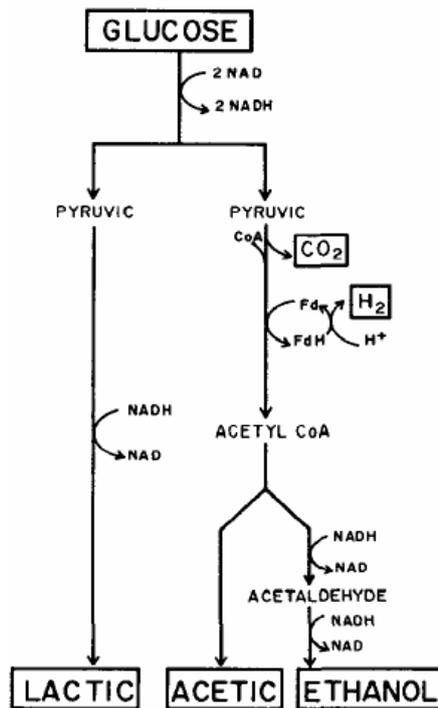


Figura 2.12. Fermentación de etanol a partir de glucosa por medio de la ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas presente en Clostridia, Enterobacterias y bacterias heterolácticas (Zeikus, 1980)

2.4.5 Productos de la fermentación de xilosa

La fermentación de xilosa, es muy similar a la fermentación de glucosa ya que los metabolitos que se forman durante el proceso de fermentación son acetato, butirato, propionato y etanol, entre algunos otros compuestos (Lin, et al., 2006; Lin y Cheng, 2006; Zhu y Yang, 2004; Taguchi, et al., 1995; Taguchi, et al., 1994).

De manera similar al caso de glucosa, Zhu y Yang (2004) reportaron que el valor de pH es un factor muy importante que afecta las rutas metabólicas de producción de ácidos orgánicos. En un estudio con *Clostridium tyrobutyricum* y xilosa como sustrato se reportó una mayor producción de butirato a un valor de pH de 6 y una mayor producción de acetato a un valor de pH 5. Así mismo, afecta el crecimiento bacteriano, la tasa de fermentación y el rendimiento.

La producción de hidrógeno a partir de xilosa como sustrato es mostrada en la Figura 2.13. En dicha figura se puede observar que la producción de hidrógeno

es por medio de la piruvato ferridoxina oxidoreductasa (PFOR) y la producción de ácidos orgánicos se lleva a cabo con la intervención de un grupo de enzimas al igual que sucede en la fermentación de glucosa (fosfotransacetilasa (PTA), acetato quinasa (AK), fosfotransbutirilasa (PTB), butirato quinasa (BK) y acetil-CoA-acetiltransferasa (Tiolasa)).

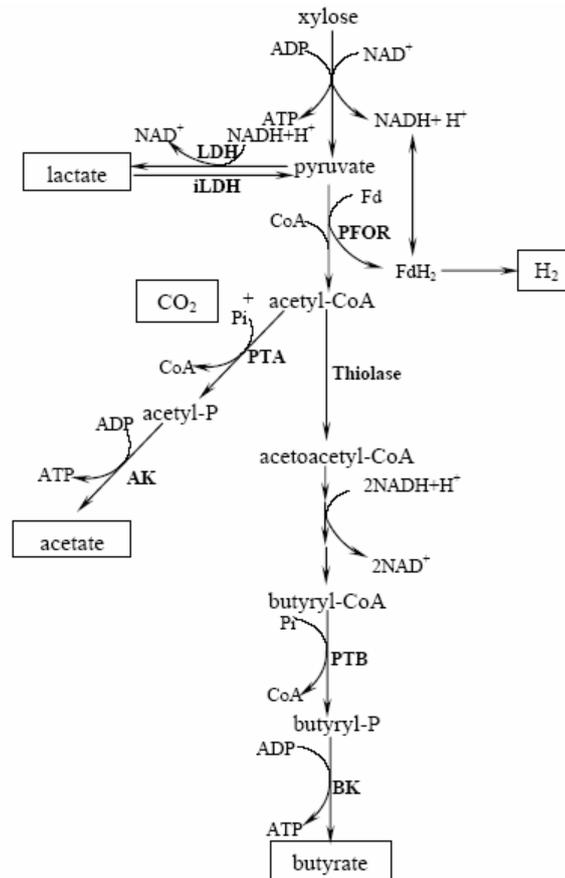


Figura 2.13. Ruta metabólica de producción de hidrógeno utilizando *C. tyrobutyricum* a partir de xilosa como sustrato (Zhu y Yang, 2004).

2.5 Factores ambientales que afectan la producción de hidrógeno

Los procesos de producción de hidrógeno por vía fermentativa son generalmente influenciado por diversos factores ambientales, como el pH, la temperatura y los requerimientos nutricionales (Oh, et al., 2003b; Lin y Lay, 2005). A continuación se describen los factores ambientales más importantes que controlan la producción de hidrógeno.

2.5.1 Valores de pH inicial

El pH del sistema tiene varios efectos sobre las actividades vitales de los microorganismos. Uno de ellos es el cambio de la carga de la membrana celular, influenciando la asimilación de sustancias nutritivas en los microorganismos. Otro efecto es sobre la actividad enzimática de los procesos metabólicos, y otra más es el cambio en la toxicidad de ciertos metabolitos, como es el caso de los ácidos grasos volátiles, que causan inhibición por la disociación no polar, debido a que penetran la membrana celular cambiando el pH interno de la célula (Van Ginkel, et al., 2005)

El pH del medio afecta el rendimiento, la composición del biogás, el tipo de ácidos orgánicos producidos y la tasa volumétrica de producción de hidrógeno. Los intervalos de pH reportados para el máximo rendimiento y la tasa volumétrica de producción de hidrogeno están entre 5 y 6 (Fang y Liu, 2002; Lay et al., 1999; Lay, 2000; Khanal, et al., 2004; Chen, et al., 2001). Sin embargo, algunas investigaciones indican pH óptimos en el rango de 6.8 y 8 (Collet, et al., 2004; Liu y Shen, 2004; Zhang, et al., 2003; Lay, et al., 2001). En el caso de cultivos termofílicos los pH óptimos están alrededor de 4.5 (Shin, et al., 2004). La mayor parte de los estudios indican que el pH final que se alcanza durante la producción fermentativa de hidrógeno esta en el intervalo de 4-4.8 sin importar el pH inicial (Liu y Shen, 2004; Zhang, et al., 2003; Liu, et al., 2003; Lay, 2001; Morimoto, et al., 2004). La disminución del pH se debe a la producción de ácidos orgánicos que agotan la capacidad amortiguadora del sistema dando como resultado un pH bajo (Khanal, et al., 2004). La disminución gradual del pH inhibe la producción de hidrógeno ya que el pH afecta la actividad del hierro que contiene la enzima hidrogenasa (Dabrock, et al., 1992). Por lo tanto, se requiere el control del pH. El pH inicial también influye en la prolongación de la fase lag de la producción de hidrógeno en lote. Algunos estudios reportan que un pH bajo entre 4-4.5 causa largos periodos de la fase lag (Liu y Shen, 2004; Khanal, et al., 2004). Un pH alto inicial de 9 disminuye el tiempo de la fase lag. Sin embargo, el rendimiento en la producción de hidrógeno disminuye (Zhang, et al., 2003).

El pH también afecta el tipo de ácidos orgánicos producidos. Se produce más ácido butírico a pH de 4.0-6.0 en cambio la concentración de acetato y de butirato puede ser casi igual en el rango de pH de 6.5-7.0 (Fang, et al., 2002).

2.5.2 Presión parcial de hidrógeno

La producción de hidrógeno a partir de sustratos orgánicos es limitada por la termodinámica de la reacción de las hidrogenasas, la cual implica la transferencia de electrones desde una molécula intracelular portadora de electrones hacia los protones. Desafortunadamente, los protones son pobres aceptores de electrones ($E'_{H_2} = -414$ mV), por lo que el donante del electrón debe ser un fuerte agente reductor. La ferridoxina es una proteína sulfuro-hierro de bajo potencial ($E^\circ_{Fd} = -400$ mV, dependiendo de la fuente), la cual es capaz de reducir los protones a hidrógeno. Otro portador de electrones intracelular importante es el NADH, ya que tiene un potencial redox más alto ($E^\circ_{NADH} = -320$ mV) (Angenent, et al., 2004). La capacidad de reducción de la ferridoxina y el NADH para reducir los protones es determinada por el potencial redox de la reacción neta bajo condiciones reales. Si se supone que las concentraciones intracelulares son iguales tanto para las formas oxidadas como para las reducidas de la ferridoxina y del NADH, la producción de hidrógeno llega a ser termodinámicamente desfavorable cuando se presenta un aumento en la presión parcial de hidrógeno. Para la ferridoxina, la producción de hidrógeno puede continuar mientras la presión parcial del hidrógeno sea menor a ~ 0.3 atmósferas (3×10^4 Pa); para el NADH, la presión parcial de hidrógeno debe ser menor a $\sim 6 \times 10^{-4}$ atmósferas (60 Pa). Altas presiones parciales de hidrógeno pueden ser logradas si el cociente de la ferridoxina reducida a ferridoxina oxidada es mayor a uno. El cambio de energía libre de la reacción de la piruvato-ferridoxina oxido reductasa ($\Delta G^\circ = -2.1$ kcal/mol) es suficiente para permitir que la reacción proceda. Por lo tanto, no es inesperado encontrar concentraciones de más del 30% de hidrógeno en el espacio libre de cabeza (Angenent, et al., 2004).

En la mayoría de los sistemas para la producción biológica de hidrógeno, todo el hidrógeno producido se puede atribuir a los electrones derivados de una sola reacción: descarboxilación oxidativa del piruvato por la piruvato: ferridoxina

oxidoreductasa (Figura 2.14). Las hexosas se pueden metabolizar a piruvato por varias rutas, a menudo esta implicada la ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas (es decir, la glucólisis) o la ruta de Entner-Doudoroff. Ambas rutas producen dos tipos de piruvato y dos tipos de NADH para cada tipo de hexosa que se transforma (Dworkin, et al., 2006). Por lo tanto, el metabolismo de asimilación de las hexosas por las bacterias que contienen piruvato: ferridoxina oxidoreductasa, puede dar lugar a la formación de dos moles de hidrógeno por mol de hexosa. Si la presión parcial del hidrógeno es suficientemente baja (<60 Pa), el NADH es producido y puede ser utilizado para generar hidrógeno (en el mejor de los casos, los dos moles adicionales del hidrógeno por mol de hexosa), pero la mayor parte del NADH será oxidado por otras rutas de la fermentación, tales como la fermentación del butirato o del acetato. Algunos de los productos de la fermentación (como por ejemplo: etanol, lactato, acetato, propionato) representan la operación de la ruta alternativa para el metabolismo del piruvato que compite con el piruvato: ferridoxina oxidoreductasa. Por lo tanto, esto está asociado a los sistemas que producen menos de dos moles de hidrógeno por mol de hexosa.

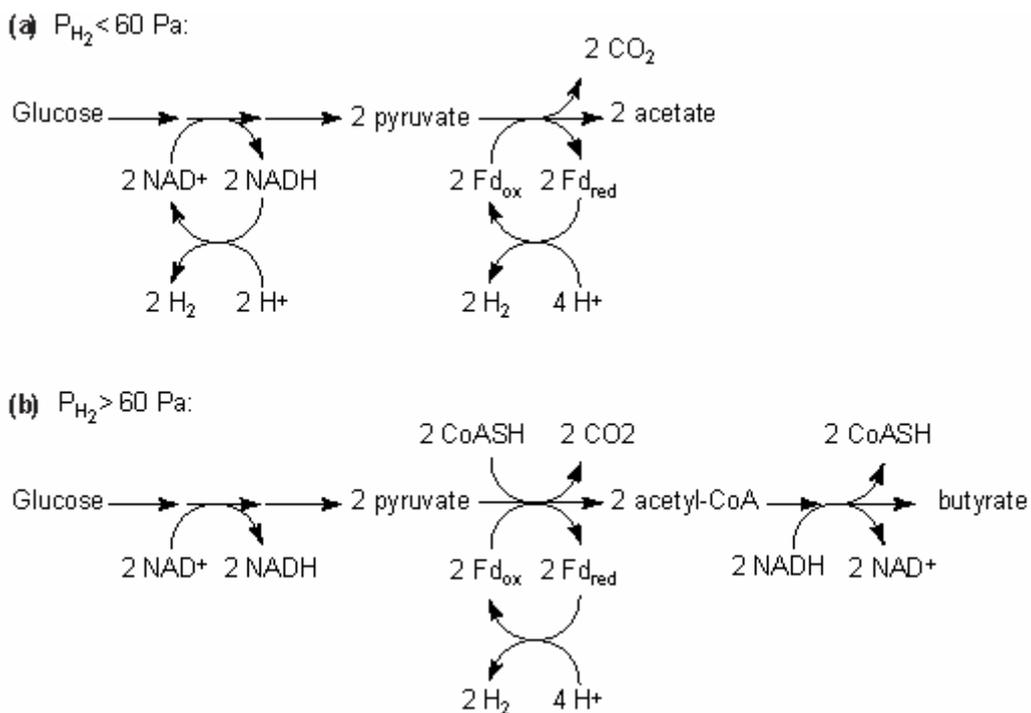


Figura 2.14. Efecto de la presión parcial de hidrógeno en la producción biológica de hidrógeno. (Angenent, et al., 2004).

2.5.3 Concentración de hierro

La producción biológica de hidrógeno requiere de micronutrientes esenciales para el metabolismo de las bacterias durante la fermentación. El sodio, magnesio, zinc y el hierro son metales traza de gran importancia que afectan la producción de hidrógeno. Entre ellos el hierro es un nutriente importante para las hidrogenasas u otras enzimas que lo necesiten fundamentalmente para la producción de hidrógeno (Yang y Shen, 2006). Todos los procesos de producción biológica de hidrógeno son fundamentalmente dependientes de la presencia de hidrogenasas. Ya que la cantidad o actividad de estas enzimas puede limitar el proceso total. En algunos estudios se ha mencionado que la concentración externa de hierro afecta la fermentación llevada a cabo por bacterias fermentativas. Zhang y Shen (2006) reportaron que el rendimiento en la producción de hidrógeno aumentaba conforme se incrementaba la cantidad de FeSO_4 al medio.

2.5.4 Nutrientes y materiales tóxicos

Lin y Lay (2004) estudiaron el efecto de la relación carbono/nitrógeno (C/N) en la producción fermentativa de hidrógeno. Los resultados mostraron que la capacidad de producción de hidrógeno está estrechamente relacionada con la relación C/N.

Los micronutrientes también afectan el metabolismo bacteriano, el incremento de la tasa y la actividad enzimática. Lin y Lay (2004) usaron un método de diseño experimental para investigar la formulación de nutrientes para la producción fermentativa de hidrógeno. Los resultados mostraron un incremento en la producción de hidrógeno con la formulación de nutrientes propuesta, la cual contenía Mg, Co, Ca, Ni, Mn, Zn, Fe, entre otros elementos.

2.5.5 Temperatura

La temperatura es uno de los factores importantes que influyen los procesos de producción biológica de hidrógeno por vía fermentativa. La degradación de sustrato, la producción de hidrógeno, la distribución de los productos y el crecimiento microbiano son todos afectados por esta (Mu, et al., 2006b).

La mayoría de los sistemas de producción de hidrógeno descritos son operados en los intervalos mesofílicos (30-35 °C) o termofílicos (50-60 °C). Por ejemplo, Mu, et al., (2006) reportan la utilización de lodo anaerobio para la producción de hidrógeno en un intervalo de temperatura de 33 a 41 °C obteniendo un rendimiento de 0.97 a 1.67 mol H₂/ mol glucosa. Por otra parte, Liu, et al., (2003) reportan la producción termofílica de hidrógeno a partir de celulosa contenida en agua residual, operando a una temperatura de 55 °C, obteniendo un rendimiento de 102 ml de hidrógeno por gramo de celulosa utilizando cultivos mixtos como inóculo.

2.6 Rendimientos y cinética de producción de hidrógeno

El rendimiento teórico máximo para la producción de hidrógeno es de 4 mol/mol de glucosa cuando se da la formación de acetato como producto de la fermentación. En cambio cuando se tiene la formación de butírico, el rendimiento es de 2 mol/ mol de glucosa (Datar, et al., 2007; Morimoto, et al., 2004). En la literatura (Tabla 2.2) se han reportado rendimientos de 0.8-2.7 mol/mol (Dávila, et al., 2007; Fang y Liu, 2002; Lay, et al., 2001). Algunos reportes utilizan mejoras tecnológicas (mejor diseño de reactores, diseño de procesos, factores ambientales de operación, etc.) para incrementar el rendimiento en la producción de hidrógeno.

Tabla 2.2. Comparación de tipos de microorganismos empleados, rendimientos y tasas de producción de hidrógeno.

Microorganismo	Sustrato	HY ^a	TVPH ^b	Referencia
		mol H ₂ / mol sustrato		
Composta de estiércol de vaca	Desecho de trigo	68.1 ^c	10.14 ^d	Fan et al. (2006)
Lodo anaerobio	Hidrolizado líquido ^f (desecho de maíz)	2.84-3.0	NR	Datar, et al., 2007
Composta de estiércol de vaca	Desecho de maíz ^f	149.69 ^c	7.6 ^d	Zhang, et al., 2007
<i>Clostridium butyricum</i> AS1.209	Desecho de maíz	63-66 ^e	NR	Li y Chen, 2007
Lodo anaerobio	Glucosa 10g/L	1.75	27.2	Zheng y Yu (2005)
Lodo anaerobio	Glucosa 21.3g/L	0.8-1.0	4.9-8.6	Cheong y Hansen (2006)
<i>Costridium butyricum</i> CGSS	Sacarosa 20gDQO/L	2.78	8.2	Chen et al. (2005)
Lodo anaerobio	Glucosa 3.76g/L	1.0	9	Salerno et al. (2006)
Lodo anaerobio	Glucosa 2.82g/L	0.968	NR	Oh et al. (2003b)
Suelo	Glucosa 4gDQO/L	0.92	NR	Logan et al. (2002)
Suelo	Sacarosa 4gDQO/L	1.8	NR	Logan et al. (2002)
Suelo	Celulosa 4gDQO/L	0.003	NR	Logan et al. (2002)

NR. No reportado; a. HY: Rendimiento; b. TVPH: Tasa volumétrica de producción de hidrógeno. c. ml H₂/gSV; d. ml H₂/ gSV h; e. ml H₂/g Steam-exploded corn straw; f. Steam-exploded.

1.1 Justificación

La utilización de materiales de desecho es una alternativa viable para la obtención de hidrógeno como fuente de energía renovable de bajo costo. Un ejemplo de estos son los materiales lignocelulósicos que son abundantes en la naturaleza; sin embargo, son muy poco biodegradables debido a su compleja estructura química. La implementación de un proceso de hidrólisis química permitirá incrementar la disponibilidad de los azúcares presentes para su fermentación. Por otra parte, se ha reportado la utilización de cultivos puros y mixtos como fuente de inóculo para llevar a cabo la producción de hidrógeno. Estos inóculos provienen de diversas fuentes: lodo anaerobio, composta de lodo, sedimentos de lagos, suelo y lodo residual, pero la utilización de microorganismos provenientes de ensilados no se ha reportado, aún cuando estos microorganismos están adaptados a la fermentación de materiales lignocelulósicos. Por lo tanto, es posible que el uso de este tipo de inóculo permita obtener un mayor rendimiento y una mayor tasa de producción de hidrógeno.

1.2 Hipótesis

La implementación de una hidrólisis química (ácida) permitirá incrementar la biodisponibilidad de azúcares provenientes de desechos de maíz y de trigo, lo cual incrementa la producción de hidrógeno por vía fermentativa.

1.3 Objetivo general

Producir hidrógeno por vía fermentativa utilizando desechos agrícolas (desecho de maíz y de trigo) como sustrato utilizando materiales ensilados como inóculos.

1.4 Objetivos específicos

- a) Selección y optimización de la preparación del inóculo a partir de dos forrajes ensilados: Rye grass y olote/desecho de maíz.
- b) Determinar el efecto de la concentración de azúcares extraídos por medio de una hidrólisis química ácida en desechos de maíz y trigo sobre la producción de H₂ (rendimiento máximo, tasa de producción y producción de metabolitos).

- c) Determinar cuál de los dos desechos bajo estudio produce el mayor rendimiento y tasa de producción de hidrógeno.

Capítulo III. Materiales y Métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Medio mineral

En todos los experimento se utilizó como medio mineral una solución concentrada de nutrientes propuesta por Van Ginkel y Sung (2001). Cada litro de solución contenía: 200 g NH_4HCO_3 , 100 g KH_2PO_4 , 10 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g NaCl , 1.0 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.278 g FeCl_2 , 1.5 g $\text{CoCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, 0.12 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.06 g ZnCl_2 . A esta solución se le adicionó 2.051 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ por litro. En los experimentos donde se determino el tipo de inóculo se empleó una solución propuesta por Visser, et al., (1993), la cual contenía por cada litro de solución: 0.040 g $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.50 g EDTA, 0.062 g H_3BO_3 , 0.10 g Na_2SeO_3 , 0.036 g $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.020 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.100 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.50 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.070 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.024 g $\text{NiCl}_5 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.070 g ZnCl_2 , 1 ml HCl 36%, 0.5 g Rezasurina. La solución de Visser se diluyó en un medio basal en una relación 1:1000. El medio basal contenía los siguientes compuestos por cada litro de solución: 0.02 g extracto de levadura, 1.5 g NH_4Cl , 0.075 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 g K_2HPO_4 , 0.75 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 1.25 g KCl.

3.1.2 Sustratos modelo

Se utilizaron glucosa grado reactivo (Fisher ChemAlert® Guide, 030061) y xilosa grado reactivo (Sigma-Aldrich, 024K3653).

3.1.3 Sustratos lignocelulósicos

El desecho de trigo se obtuvo en un campo de cultivo que esta en los límites del estado de Guanajuato y Michoacán, y el desecho de maíz fue conseguido en la Central de Abastos de la ciudad de San Luís Potosí, ambos desechos agrícolas fueron molidos a un diámetro menor de 2 mm.

3.1.4 Fuente de inóculo

La microflora (inóculo) productora de hidrógeno fue extraída de ensilados de Rye grass y de rastrojo y olote de maíz, proveniente de la empresa de productos lácteos Carranco, ubicada en el Municipio de Villa de Reyes, San Luís Potosí.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparación del inóculo

El ensilado (10 g) fue resuspendido en 500 ml de agua destilada. A esta suspensión se le adicionaron 5 ml de medio mineral Van Ginkel y se mantuvo en agitación constante por un periodo de una hora, utilizando un agitador magnético. Se dejó reposar por un lapso de 30 minutos y se separó el sobrenadante, el cual se llevó a ebullición, por un lapso de una hora. Con esto último se logró enriquecer el inóculo en bacterias anaerobias esporuladas productoras de hidrógeno y también se inactivo a las bacterias consumidoras de hidrógeno, favoreciendo con esto una buena producción de hidrógeno.

3.2.2 Conteo de esporas

El conteo de esporas se llevó a cabo por el método de Wirtz-Conklin (Harley, 2002). El fundamento del método consiste en que algunos géneros bacterianos, entre los que destacan *Clostridium* y *Bacillus*, producen en su interior formas de resistencia denominadas endosporas, que se producen cuando las condiciones ambientales son desfavorables (agotamiento de los nutrientes, temperaturas extremas, radiaciones, compuestos tóxicos, etc.) formándose una spora por cada forma vegetativa. Las endosporas poseen cubiertas que hacen que las esporas aparezcan en el microscopio óptico como estructuras refringentes y de difícil tinción.

La tinción específica de esporas requiere dos colorantes:

- 1.- Verde malaquita: capaz de teñir las esporas en caliente.
- 2.- Safranina: colorante de contraste que tiñe las formas vegetativas.

Las endosporas tras la primera tinción, no perderán el colorante en el lavado con agua y sí lo harán las formas vegetativas, que quedarán teñidas con el segundo colorante.

Se prepararon los frotis bacterianos. Estos fueron teñidos con verde malaquita y puestos encima de un mechero por 5 minutos (esto sin dejar que se secase el colorante) para fijar la muestra. Posteriormente se lavó con abundante agua el exceso de colorante. En un segundo paso se tiñó la muestra con safranina y se dejó reposar por un minuto. Posteriormente se lavó con abundante agua para

remover el exceso de colorante, dejándolo secar para su posterior observación en el microscopio a una resolución de 40x.

3.2.3 Pretratamiento químico de los desechos agrícolas

3.2.3.1 Tratamiento ácido

El desecho molido (40 g) fue suspendido en 800 ml de HCl al 2%, con una agitación constante y una temperatura de 90 °C por un lapso de dos horas. Esta suspensión fue filtrada para colectar el hidrolizado líquido, en el cual se hicieron posteriormente las determinaciones de concentración de los azúcares solubilizados. El desecho sólido fue colectado y lavado extensivamente con agua desionizada hasta llegar a un pH de 6.5. Luego se procedió a secar el desecho sólido a 50 °C para su posterior procesamiento.

3.2.4 Ensayos en lote

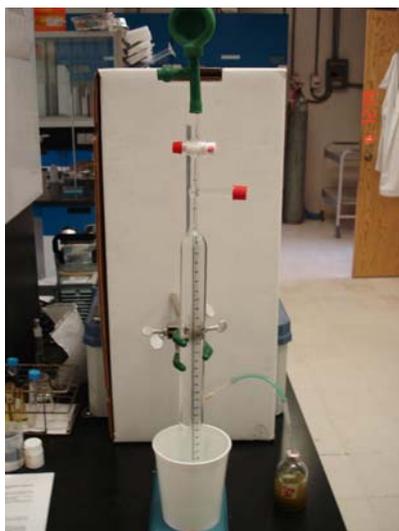
3.2.4.1 Descripción del ensayo

Los experimentos en lote fueron llevados a cabo en botellas serológicas de 120 ml, con un volumen de trabajo de 80 ml, dejando un espacio de cabeza de 40 ml a cada botella, todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado. Se agregó a cada botella 1 ml de solución concentrada de medio mineral, 2 ml de inóculo resuspendido y 77 ml de la solución del sustrato correspondiente o agua destilada para los experimentos donde se emplearon los desechos agrícolas sin tratar. Se utilizaron 2 g/L de glucosa como sustrato para la selección del inóculo, el pH inicial, la cantidad de esporas empleadas y la temperatura inicial, así como también en los experimentos de selección de inóculo se utilizó el medio mineral propuesto por Visser o en su defecto en los experimentos que lo requerían se les adiciono 1 ml del medio mineral propuesto por Visser con o sin la adición de hierro. Para todos los demás experimentos el medio mineral empleado fue el propuesto por Van Ginkel con la adición de hierro. Para los experimentos con los sustratos modelos (glucosa y xilosa) las concentraciones empleadas fueron de 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 g/L. Los experimentos con los hidrolizados ácidos líquidos se llevaron a cabo utilizando las soluciones sin diluir, teniendo una concentración de 9 g/L de glucosa y 1.8 g/L de xilosa en el caso del hidrolizado líquido de maíz y una concentración de 6 g/L de glucosa y 0.3 g/L de xilosa para el hidrolizado líquido

de trigo, además se emplearon diluciones 1:2 y 1:4 para ambos hidrolizados. Para los experimentos donde se emplearon los desechos agrícolas (maíz y trigo) sin tratar se utilizaron concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 gSVT. El pH de cada uno de los experimentos en lote se ajustó a un valor de 5.5 utilizando HCl 10 N. Finalmente, las botellas se burbujearon con N₂ gas para dejar una atmósfera inerte (Park, et al. 2005, Kim, et al. 2006), fueron selladas con tapones de hule y anillos metálicos, para ser incubadas a 37 °C con una agitación en un agitador orbital horizontal a 180-200 rpm.

3.2.4.2 Cuantificación y composición del biogás

La producción de hidrógeno se midió por medio de una bureta invertida de 250 ml (modificada en la parte superior, para llevar a cabo la toma de muestra del gas producido y despresurizado, Figura 3.1).



3.1 Fotografía del dispositivo para la cuantificación del biogás producido durante el proceso de fermentación.

El volumen final de hidrógeno producido en cada intervalo de tiempo se contabilizó sumando el acumulado en el espacio de cabeza y el liberado por el desplazamiento de líquido (utilizando agua acidificada con HCl).

En cada una de las botellas serológicas se tomó una muestra de 0.2 ml del gas producido (H₂ y CO₂) y despresurizado por medio de una jeringa Pressure-Lok[®] de 1.0 ml (Valco Instruments). Para determinar la concentración de H₂ y CO₂ se

utilizo un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies, 6890N) equipado con detector de conductividad térmica y una columna de 30 m, empacada con el polímero Haye Sep D (Valco Instruments). Se utilizó nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 12.0 ml/min y las temperaturas de operación del inyector y detector fueron de 250 °C y del horno de 60 °C.

Para contabilizar el hidrógeno producido en cada intervalo de tiempo, se sumo el acumulado en el espacio de cabeza y el liberado por desplazamiento de líquido. En cada experimento, la producción acumulativa de hidrógeno se obtuvo a diferentes tiempos mediante la siguiente ecuación de balance reportada por Park, et al., (2005):

$$H_{H,i} = V_{H,i-1} + C_{H,i} V_{G,i} + V_H (C_{H,i} - C_{H,i-1})$$

Donde $H_{H,i}$ es el volumen de hidrógeno en el tiempo i (ml), $V_{H,i-1}$ es el volumen en el tiempo $i-1$ (ml), $C_{H,i}$ es la concentración de hidrógeno en el espacio de cabeza en el tiempo i (%v/v), $C_{H,i-1}$ es la concentración de hidrógeno en el espacio de cabeza en el tiempo $i-1$ (%v/v), $V_{G,i}$ es el volumen del biogás liberado del reactor en el tiempo i (ml) y V_H es el espacio de cabeza del reactor.

3.2.4.3 Análisis de datos

3.2.4.3.1 Ecuación de Gompertz

Los datos obtenidos de la producción acumulativa de hidrógeno (ml) a cada uno de los diferentes tiempos fueron ajustados mediante una función de tipo sigmoideal. La ecuación utilizada fue la siguiente:

$$H(t) = H_{\max} \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R^* e}{H_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

la cual es una modificación de la ecuación de Gompertz que ha sido ampliamente utilizada en experimentos de producción de hidrógeno (Chen, et al., 2006a; Mu, et al., 2006b; Khanal, et al., 2004). En esta ecuación $H(t)$ es la producción de H_2 como función del tiempo de fermentación (ml), H_{\max} es la producción total de H_2 (ml), R es la tasa de producción de H_2 en la fase exponencial (ml/h) y λ es el tiempo que transcurre antes de iniciar la fase exponencial de producción de gas (fase *lag*, h). Para hacer el ajuste de la

regresión no lineal de los datos experimentales obtenidos en la producción de hidrógeno se utilizó el programa SigmaPlot 2001 para Windows versión 7.0.

Los datos ajustados con esta ecuación, se utilizaron para determinar la tasa volumétrica de producción de hidrógeno (TVPH), la cual fue calculada dividiendo la tasa de producción de hidrógeno (R_m) por el volumen de reacción y el rendimiento de la producción de hidrógeno (HY), el cual fue calculado dividiendo H_{max} por el sustrato consumido.

3.2.4.3.2 Análisis de varianza (ANOVA)

Los datos obtenidos del ajuste con la ecuación de Gompertz fueron analizados por medio de un método estadístico para determinar la similitud o diferencias significativas entre ellos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar. Los análisis de ANOVA se hicieron mediante el empleo de un programa estadístico (The SAS System para Windows versión 8.02).

3.2.5 Métodos analíticos

3.2.5.1 Electroforesis capilar

La concentración de azúcares (glucosa y xilosa) en los hidrolizados líquidos, así como las concentraciones de los subproductos formados durante la fermentación (ácidos grasos volátiles: acético, butírico y propiónico), y el consumo de glucosa y xilosa fueron determinadas mediante un equipo de electroforesis capilar (Agilent, modelo 1600A). Se empleó un capilar de 72 cm de longitud efectiva y un buffer básico (pH 12.1). A 950 μ l de muestra de los ensayos de fermentación en lote se les añadió 50 μ l de HCl al 50% y se centrifugó a 5000 rpm por 15 min en una microcentrifuga (Tomy Capsule, Hoefer Scientific Instruments). Antes de ser analizadas las muestras se mantuvieron en congelación. Las muestras para EC se filtraron con una membrana Durapore (Millipore) de 0.22 μ m antes de ser analizadas usando el software Chemsation B.01.03.204 (Soga y Ross, 1999).

3.2.5.2 Carbono orgánico total (COT)

Se hicieron determinaciones de carbono orgánico total en los desechos agrícolas, en la fracción hidrolizada líquida, y en el desecho sólido del hidrolizado para realizar un balance de masa del carbono presente en estas fracciones. Para este análisis se empleó un analizador de Carbono Orgánico Total (TOC-VCSN, Shimadzu) con un detector de carbono total en muestras líquidas que utiliza viales de 24 ml con la tapa de rosca, mediante el empleo de un método de oxidación catalítica a 680 °C y un detector de carbono total en muestras sólidas (SSM-5000A) que utiliza un método de oxidación por combustión catalítica a 900 °C y O₂ al 99.9% como gas portador.

3.2.5.3 Análisis de hemicelulosa, celulosa y lignina presentes en los desechos agrícolas

Estas determinaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fertilidad de Suelos y Nutrición Vegetal del INIFAP, Campo Experimental Bajío, Celaya, Guanajuato, bajo sus estándares de calidad. A continuación se muestra la marcha analítica y se explica el fundamento de los métodos utilizados.

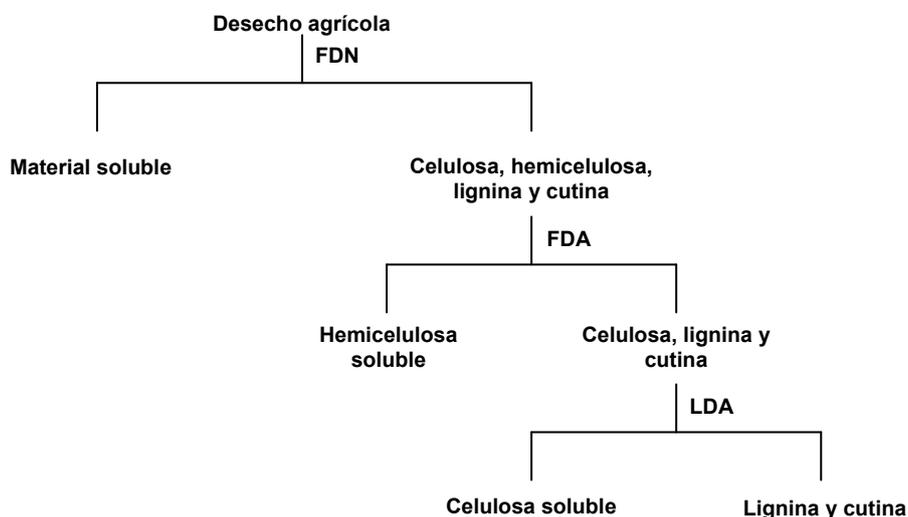


Figura 3.2 Esquema general de la determinación de hemicelulosa, celulosa y lignina en los desechos agrícolas.

3.2.5.3.1 Fibra detergente neutro (FDN)

Este método se basa en la determinación de los constituyentes de paredes celulares de origen vegetal (celulosa, hemicelulosa y lignina) propuesto por Van Soest para el análisis de la fracción fibrosa de forrajes.

3.2.5.3.2 Fibra detergente ácido (FDA)

Este método se basa en la determinación de lignocelulosa en compuestos vegetales. El detergente disuelve todo el contenido celular y además a la hemicelulosa, por lo que el desecho insoluble está formado por paredes conteniendo lignocelulosa y silica. Por tanto, la diferencia entre la FDN y la FDA es un estimador de la hemicelulosa. Esta determinación es utilizada como un paso previo a la determinación de lignina.

3.2.5.3.3 Lignina detergente ácido (LDA)

El procedimiento de la LDA utiliza la determinación de FDA como paso preparatorio. El detergente elimina la proteína y cualquier otro material soluble en ácido. El desecho insoluble de FDA consiste en celulosa, lignina, cutina y ceniza insoluble en ácido (principalmente silica). El tratamiento del desecho insoluble de FDA con ácido sulfúrico al 72% disuelve la celulosa. Por calcinación del desecho insoluble de la hidrólisis con ácido sulfúrico se determina la fracción de lignina cruda incluyendo cutina.

3.2.5.4. Sólidos totales y volátiles

La determinación del contenido de sólidos totales (ST) y de sólidos volátiles (SVT) se realizó de acuerdo con a Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998). Los ST se determinaron mediante el peso del desecho seco, secado a 105 °C en una estufa marca Precision (Econotherm Oven), durante 12 horas, referido al peso de la muestra seca inicial. Para el cálculo se utiliza la siguiente expresión:

$$\text{Sólidos _Totales (\%)} = \text{ST (\%)} = \frac{\text{Peso}_{105^{\circ}\text{C}} - \text{Peso_tara}^*}{\text{Peso_muestra}} * 100$$

*Peso tara: es el peso constante de la capsula de porcelana.

La determinación de los sólidos volátiles totales (SVT) se realizó sobre la misma muestra, mediante calcinación, en un mufla marca Vulcano™ (A-1750), a 550 °C durante 2 horas. El contenido en sólidos volátiles se determina por diferencia entre el desecho seco y las cenizas, siguiendo la siguiente expresión:

$$\text{Sólidos _Volátiles (\%)} = \text{SVT (\%)} = \frac{\text{Peso}_{105^{\circ}\text{C}} - \text{Peso}_{550^{\circ}\text{C}}}{\text{Peso _muestra}} * 100$$

Capítulo IV. Resultados y Discusión

4.1 Efecto del medio mineral y del tipo de inóculo utilizado en la producción de hidrógeno

Para los experimentos en lote, se utilizaron dos fuentes de inóculo: una proveniente de ensilado de Rye grass (E-RGrass) y otra de ensilado de desecho de maíz y olote (E-Rmaíz), y como sustrato se utilizó glucosa (2 g/L), todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Las cinéticas de producción de hidrógeno se llevaron a cabo utilizando dos diferentes medios minerales: uno reportado por Van Ginkel (2001) para la producción de hidrógeno y otro reportado por Visser (1993) para la determinación de la actividad metanogénica. Estos medios minerales se escogieron en base al tipo y la concentración de minerales esenciales y micronutrientes presentes en cada uno de ellos. Por lo tanto, estos experimentos nos permitieron definir el medio mineral y el inóculo más adecuados para estudiar la producción de hidrógeno en experimentos posteriores.

En las Figuras 4.1a y 4.1b se observa que la producción de hidrógeno se incremento gradualmente y se mantuvo por un período de 30 horas. Este experimento indicó que los microorganismos obtenidos de ambos ensilados después del tratamiento térmico son buenos productores de hidrógeno. Adicionalmente no se observó producción de metano en los análisis llevados a cabo en el CG-TCD. A partir de las Figuras 4.1a y 4.1b se calcularon los valores de H_{max} y R utilizando la ecuación de Gompertz. Los coeficientes de correlación obtenidos con dicha ecuación fueron altos (aproximadamente, $R^2 > 0.99$).

También se puede observar en las Figura 4.1a y 4.1b que la fase lag en la producción de hidrógeno, para los experimentos llevados a cabo con el medio reportado por Visser fue mas corta (4 horas), en comparación a los experimentos donde se utilizo el medio reportado por Van Ginkel, con y sin la adicción de hierro (8 horas). Esta diferencia se podría deber entre otros factores, a que el medio mineral propuesto por Visser contiene algunos elementos traza que no están presentes en el medio propuesto por Van Ginkel,

en especial una mayor cantidad de hierro, el cual se ha reportado que aumenta la producción de hidrógeno (Zhang y Shen, 2006; Lin y Lay, 2005).

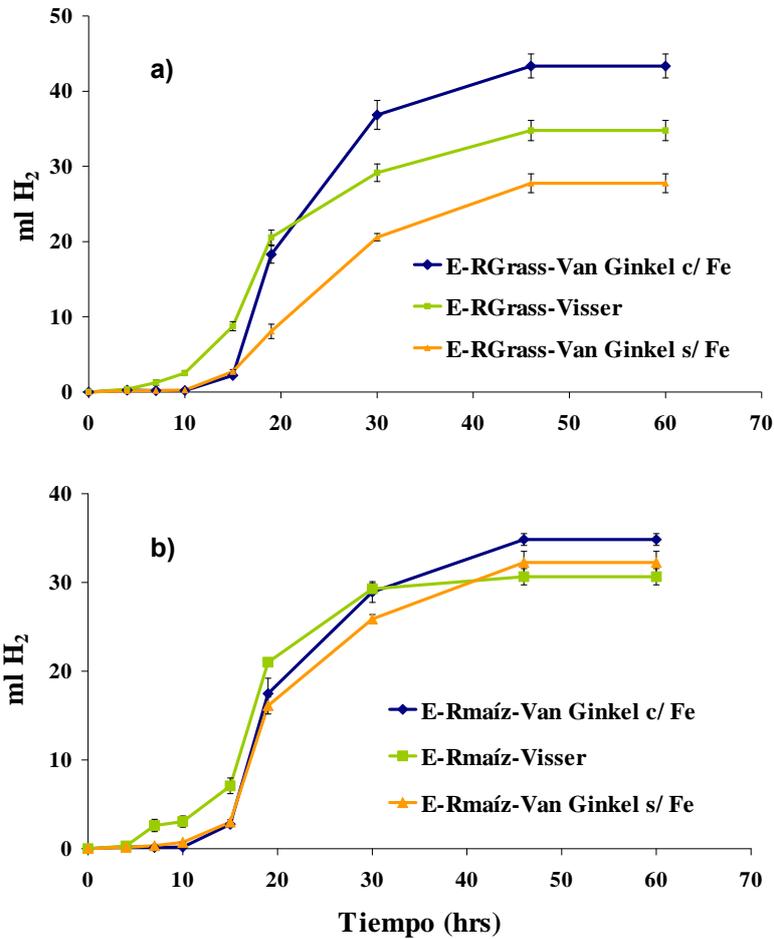


Figura 4.1. Perfiles de producción de hidrógeno con a) ensilado de Rye grass y b) ensilado de rastrojo de maíz y olote como inóculo usando tres medios de cultivo

Por lo tanto, se realizaron experimentos en los cuales se adicionó hierro al medio mineral de Van Ginkel hasta alcanzar una concentración similar al del medio de Visser. La producción acumulativa máxima de hidrógeno (H_{max}) obtenida con la adición de hierro fue mayor, en comparación a las obtenidas con los medios reportados por Van Ginkel sin la adición de hierro y Visser.

En la Tabla 4.1 se muestran los valores para el rendimiento de la producción de hidrógeno (HY) y la tasa volumétrica de producción de hidrógeno (TVPH) obtenidos a partir de H_{max} y R . Dichos valores se encuentran en el intervalo de 1.04 a 1.6 mol H₂/mol glucosa_{removida} y 0.622 a 1.407 (mmol H₂/L-h), respectivamente.

En el caso del ensilado de Rye grass, los valores mas altos de la TVPH y HY se observaron con el medio mineral propuesto por Van Ginkel adicionado de hierro (2.56×10^{-5} g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O/L}$, concentración final en cada lote). Para el ensilado de rastrojo de maíz y olote, esto último se observó solo para el HY. Por lo tanto, estos datos indican que la adición de hierro al medio mineral de Van Ginkel, tiene un efecto benéfico sobre los microorganismos presentes en el ensilado de Rye grass.

Tabla 4.1. TVPH y HY obtenidos en los experimentos en lote para la selección del tipo de medio mineral y fuente de inóculo.

Tipo de ensilado y tipo de medio mineral)	TVPH (mmol $\text{H}_2/\text{L-h}$)	HY (mol H_2/mol glucosa_{removida})
E-RGrass-Van Ginkel (sin hierro)	0.62	1.04
E-RGrass-Van Ginkel (con hierro)	1.40	1.60
E-RGrass-Visser	0.81	1.29
E-Rmaíz-Van Ginkel (sin hierro)	0.68	1.15
E-Rmaíz-Van Ginkel (con hierro)	0.88	1.25
E-Rmaíz-Visser	1.30	1.14

El hierro ha sido ampliamente reportado como elemento imprescindible en el metabolismo de los microorganismos productores de hidrógeno y en concentraciones apropiadas el hierro promueve la producción de hidrógeno (Dabrock, et al., 1992; Zhang, et al., 2005). La importancia que tiene el hierro en estos sistemas se debe a que es el precursor de la activación de la hidrogenasa para la producción de hidrógeno como producto final de la disposición de los equivalentes reductores provenientes de la glucólisis (Zhang y Shen, 2006). En este proceso, el donador primario de electrones para la hidrogenasa es la ferridoxina, que recibe electrones de los productos reducidos de la glucólisis, es decir NADH o NADPH. La hidrogenasa presente en las bacterias anaerobias oxida a la ferridoxina reducida para producir hidrógeno molecular (Vignais y Colbeau, 2004; Vignais, 2005).

En base a estos resultados se decidió utilizar el inóculo proveniente del ensilado de Rye grass, utilizando el medio mineral propuesto por Van Ginkel adicionado de hierro para los estudios posteriores de producción de hidrógeno.

4.2 Optimización de las condiciones de crecimiento del inóculo

4.2.1 Efecto del pH inicial en la producción de hidrógeno.

Se realizaron varios experimentos en lote, para evaluar el efecto que tenía el valor inicial de pH sobre la producción de hidrógeno, utilizando como inóculo el ensilado de Rye grass. El efecto del pH inicial en HY y en TVPH se muestra en las Figura 4.2 y 4.3, respectivamente.

La Figura 4.2 muestra que al aumentar el valor del pH inicial desde 3.5 hasta 6.5 ocurre un incremento en el rendimiento de la producción de hidrógeno de 0.036 hasta 1.58 mol H₂/ mol glucosa y presenta un decaimiento a un pH inicial de 7.5.

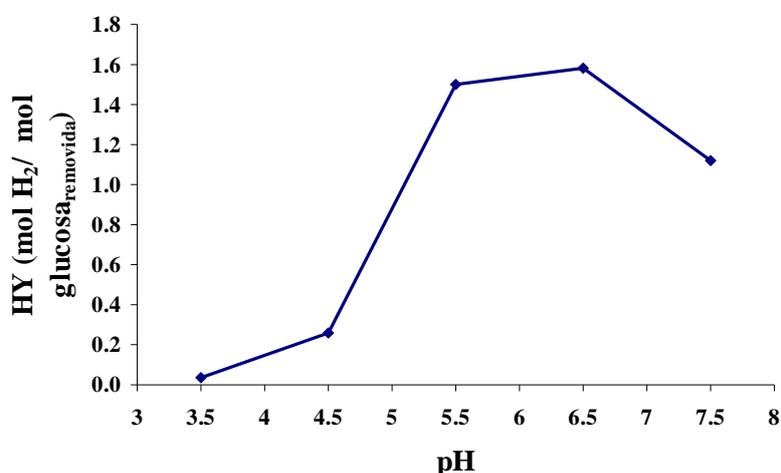


Figura 4.2. Rendimiento de la producción de hidrógeno a diferentes valores de pH iniciales.

Los valores de TVPH obtenidos (Figura 4.3) muestran una tendencia similar a los que se obtuvieron para el HY. Se realizó un análisis de modelo general ANOVA con los valores de HY y TVPH a pH de 5.5 y 6.5 para determinar si había una diferencia significativa en la producción de hidrógeno. Los resultados obtenidos a partir de esta prueba estadística no presentaron diferencia significativa (valor-p 0.05). Por lo tanto, los valores de pH iniciales entre 5.5 y 6.5 representan un intervalo óptimo de pH para la producción de hidrógeno, llevada a cabo por los microorganismos presentes en el ensilado de Rye grass. Estos resultados de pH óptimo son similares a los reportados en la literatura para la producción de hidrógeno, utilizando diversos tipos de inóculos (Van Ginkel y Sung, 2001; Khanal, et al., 2004).

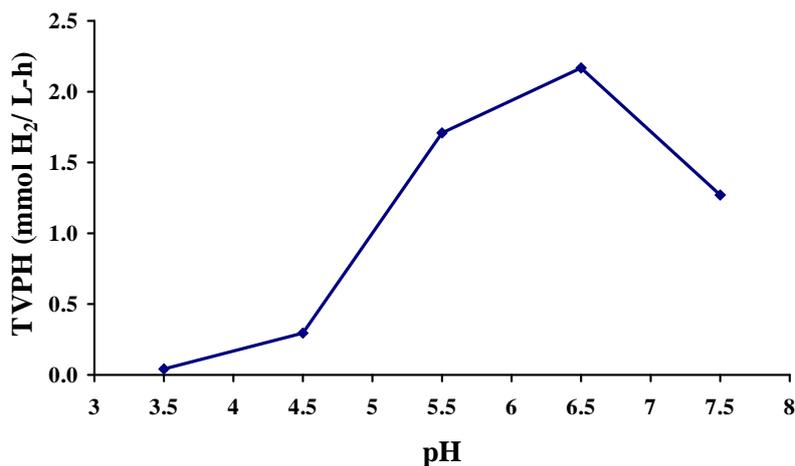


Figura 4.3. Tasa volumétrica de producción de hidrógeno a diferentes valores de pH iniciales.

En base a estos resultados se utilizó para los experimentos posteriores un pH de 5.5. Adicionalmente, a este valor de pH se favorece el crecimiento de bacterias productoras de hidrógeno y se evita el crecimiento de bacterias consumidoras de hidrógeno.

4.2.2 Efecto de la cantidad de inóculo en la producción de hidrógeno.

La microflora del ensilado de Rye grass utilizada para la realización de estos experimentos en lote fue expuesta a un tratamiento térmico para inhibir a los microorganismos consumidores de hidrógeno (bacterias metanogénicas, homoacetogénicas y sulfatoreductoras) y seleccionar a las bacterias formadoras de esporas y productoras de hidrógeno tales como algunas especies de *Clostridium* y *Bacillus* (Cheong y Hansen, 2006; Kahanal, et al., 2004).

Por lo tanto se decidió evaluar el efecto de la cantidad de esporas sobre la producción de hidrógeno. En la Tabla 4.2 se muestran los valores de TVPH y HY obtenidos a partir de diferentes cantidades de esporas añadidas en experimentos en lote.

Tabla 4.2. TVPH y HY obtenidas en experimentos en lote para la evaluación de la cantidad de esporas.

Número de esporas (totales)	TVPH (mmol H ₂ /L-h)	HY (mol H ₂ /mol glucosa _{removida})
40	0.83	1.36
80	0.91	1.48
120	0.95	1.55
160	0.87	1.41
200	0.96	1.57
240	0.94	1.53

Se realizó un ANOVA con los valores de TVPH y HY obtenidos a diferente concentración inicial de esporas, para determinar si había una diferencia significativa en la producción de hidrógeno. Los resultados obtenidos en el análisis del TVPH a partir de esta prueba estadística no presentaron diferencia significativa (valor-p 0.05). Sin embargo con el análisis de los valores del HY (1.36 a 1.53 mol H₂/mol glucosa) se encontró que a mayor cantidad de esporas mayor rendimiento (valor-p 0.0609). Los mayores valores de HY se obtuvieron utilizando 120, 200 y 240 esporas. Por lo tanto, para los experimentos posteriores se emplearon 120 esporas ya que de esta forma se emplean el menor número de esporas con el cual se obtuvo el mayor rendimiento.

4.2.3 Efecto de la temperatura sobre la producción de hidrógeno

Algunos estudios para determinar el efecto de la temperatura sobre la producción de hidrógeno se han llevado a cabo utilizando microflora proveniente de lodos residuales (Lin y Chang, 2004; Mu, et al., 2006). Sin embargo, los datos sobre el efecto de la temperatura en la producción de hidrógeno con microflora de ensilados no se ha reportado. Considerando que durante el proceso de ensilaje de ciertos materiales, Rye grass por ejemplo, se alcanzan temperaturas altas (alrededor de 60 °C), se evaluó la producción de hidrógeno en el intervalo de 37 a 70 °C. Con esto se trató de determinar si los microorganismos termofílicos presentes en este tipo de inóculo pudieran estar involucrados en la producción de hidrógeno.

La H_{max} obtenida con estos experimentos esta en el intervalo de 1.5 a 35.8 ml de hidrógeno, utilizando una temperatura inicial de 37 a 70 °C. Por otro lado, en la Tabla 4.3 se muestra los valores de TVPH y HY obtenidos con las diferentes

temperaturas empleadas. Los valores de TVPH y HY (0.036 a 0.832 mmol H₂/L-h y 1.35 a 0.058 mol H₂/mol glucosa, respectivamente) presentaron un decaimiento con el aumento de la temperatura desde 37 a 70 °C. Estos resultados indicaron que la microflora productora de hidrógeno presente en el ensilado de rye grass crece en un óptimo de temperatura mesofílica.

Tabla 4.3. TVPH y HY obtenidos en los experimentos en lote a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	TVPH (mmol H ₂ / L-h)	HY (mol H ₂ /mol glucosa _{removida})	H _{max} (ml)
37	0.83	1.35	35.9
55	0.31	0.51	13.7
65	0.04	0.07	2.0
70	0.03	0.05	1.5

4.3 Cinética de producción de hidrógeno a partir de azúcares presentes en desechos agrícolas

4.3.1 Glucosa

Se realizaron experimentos a diferentes concentraciones de glucosa (2-24 g/L) por triplicado, para evaluar el efecto que tiene la concentración de azúcar en la producción de hidrógeno. Las H_{max} que se obtuvieron se encontraron en el intervalo de 38.5 a 156.1 ml de hidrógeno, empleando diferentes concentraciones de glucosa (Figura 4.4a). Así mismo, al final del tiempo de incubación de estos experimentos el pH disminuyó desde un valor inicial de 5.5 hasta valores en el intervalo de 3.3 a 4.2. Esto último se debió a la formación de ácidos grasos volátiles (AGV) principalmente ácido acético y ácido butírico (Figura 4.4b).

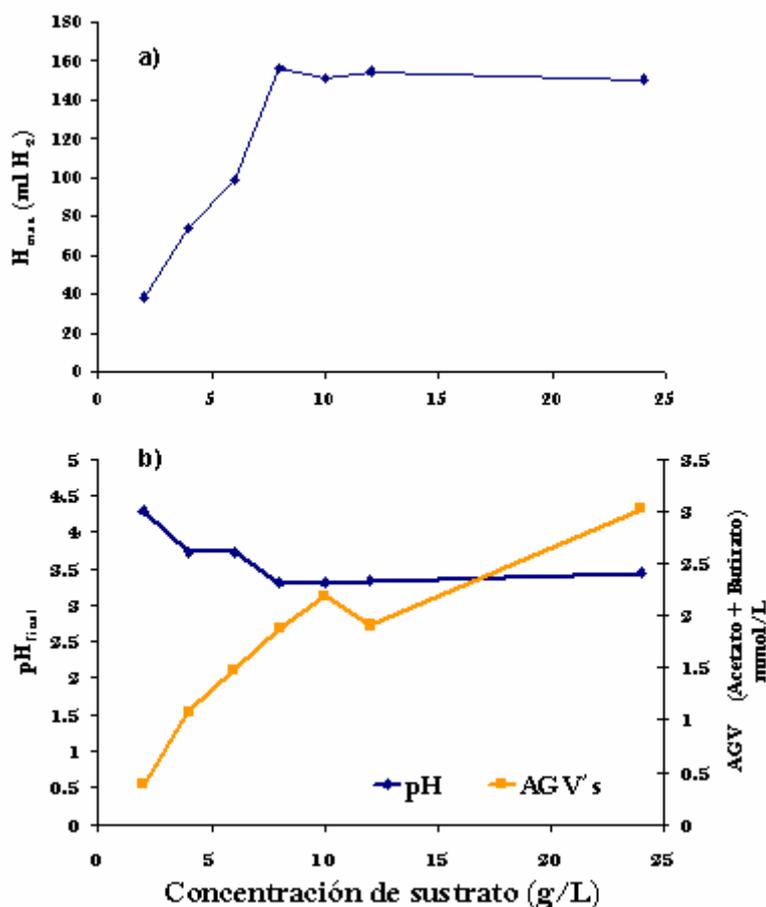


Figura 4.4. a) H_{max} y b) pH final y concentración de AGV's final en cada una de las concentraciones evaluadas de glucosa

Los perfiles de AGV producidos al final del proceso de fermentación de la glucosa, con las diferentes concentraciones ensayadas, se muestran en la Figura 4.5. Acetato y butirato fueron detectados en el proceso, con una nula producción de ácido propiónico. La concentración total de AGV final encontrada en los experimentos (0.24 a 2.21 mmol de ácido acético y 0.138 a 1.335 mmol de ácido butírico) corresponden a concentraciones de 3.07 a 27.70 mM y 1.73 a 17.0 mM de ácido acético y ácido butírico respectivamente. Estas concentraciones se encuentran en el intervalo de concentraciones inhibitorias de la producción de hidrógeno (~2 a 30 mM) reportado por Van Ginkel, et al., (2005). La inhibición es causada a valores de pH bajos por los ácidos no disociados no polares presentes, los cuales pueden penetrar la membrana celular. Una vez en el interior de la célula los ácidos disocian un protón y disminuyen el pH interno, colapsando el gradiente de pH, resultando todo esto

en una disminución progresiva de la velocidad específica de crecimiento (Jones y Woods, 1986).

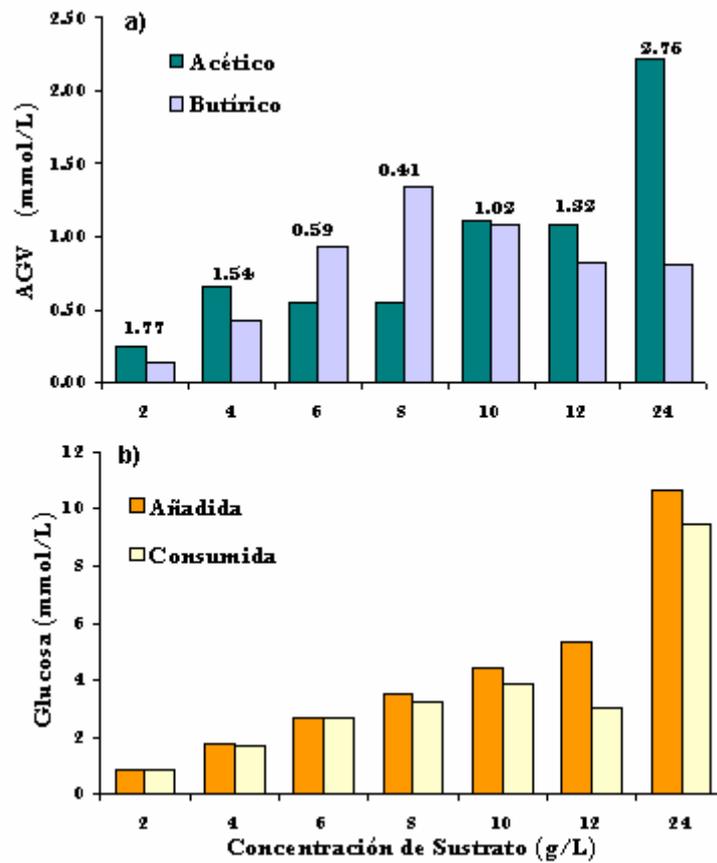


Figura 4.5. a) Concentración final de AGV y relación Acético/Butírico, y b) Cantidad de glucosa añadida y residual en cada uno de los experimentos

En la Figura 4.5 se observa que alrededor del 93% de la glucosa añadida fue consumida en casi todos los ensayos, con excepción de los realizados con 12 g/L de glucosa, donde solamente se consumió un 57 %. La relación acetato/butirato (Ac/Bu) se muestra en la Figura 4.5. Los valores obtenidos para esta relación al final de la fermentación estuvieron en el intervalo de 0.41 a 2.76 y fueron dependientes de la concentración de sustrato utilizado, donde el mayor valor obtenido se obtuvo con la concentración mayor de glucosa.

Por otra parte, los valores de HY (Figura 4.6) variaron en el intervalo de 1.45 a 1.64 mol H₂/mol glucosa_{removida} cuando la concentración inicial de glucosa varió en el intervalo de 2 a 12 g/L. Estos rendimientos están muy alejados del rendimiento teórico máximo (4 moles H₂/mol glucosa_{removida}), sin embargo son

similares a los reportados por Morimoto, et al. (2004) y Mu et al. (2006a), quienes encontraron valores de HY en el intervalo de 1.0 a 2.1 utilizando glucosa como sustrato y lodos anaerobios como fuente de inóculo.

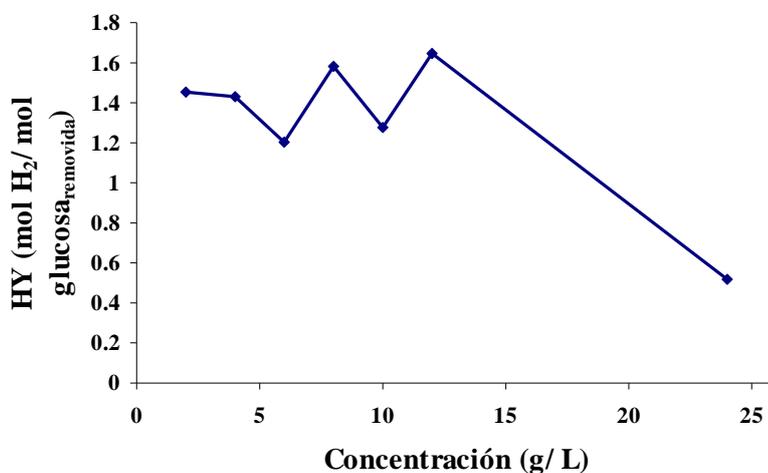


Figura 4.6. Rendimiento de hidrógeno (HY) a partir de diferentes concentraciones de glucosa

Sin embargo, en la Figura 4.6 se puede observar que cuando la concentración inicial de glucosa se incrementó hasta 24 g/L HY disminuyó bruscamente hasta 0.51 mol H₂/mol glucosa_{removida}. Esta disminución estuvo asociada a un consumo considerable de glucosa y a una alta producción de acetato (Figura 4.5), así como a un pH final de 3.4 (Fig. 4.4). Lay (2000) reporta una máxima eficiencia en la producción de hidrógeno a pH 5, indicando que a valores de pH menores a 5 el rendimiento cae, debido a la disminución de la actividad de la hidrogenasa que se ve afectada a valores de pH bajos (Lay, et al., 2001; Dabrock, et al., 1992).

Dada la estequiometría mostrada en las ecuaciones 2.3 y 2.4, asociada a un aumento en la concentración de AGV's, (acético y butírico), se esperaría un incremento en la producción de hidrógeno y por lo tanto del rendimiento. Sin embargo la producción de hidrógeno (H_{max}) fue similar en el intervalo de 8 a 24 g/l de glucosa (Fig. 4.4), mientras que como ya se menciona, el rendimiento disminuyó dramáticamente a la concentración más alta de glucosa ensayada (24 g/l). Esto se podría explicar suponiendo que los equivalentes reductores producidos durante la fermentación en vez de dirigirse hacia la producción de hidrógeno, se pudieron haber dirigido hacia la producción de otros metabolitos.

Por ejemplo, el hecho de que la disminución dramática de HY esta asociada a un incremento considerable de la concentración de acetato podría indicar que los equivalentes reductores se dirigieron a la síntesis de acetato a través de un proceso de fermentación homoacetogénico (Park, et al., 2005). Otra alternativa es que los equivalentes reductores se dirigieron hacia la formación de solventes (Jones y Woods, 1986; Van Ginkel, et al., 2005). En el presente trabajo no se midió la formación de solventes. Sin embargo, Hartmanis y Gatenbeck (1984), Bahl y colaboradores (1982) sugirieron que durante la fermentación de hidrógeno este proceso puede cambiar hacia una reacción de solventogénesis como un mecanismo de detoxificación, una vez alcanzados los umbrales críticos de concentración de los ácidos grasos sin disociar.

En la Figura 4.7 se muestran los valores de TVPH obtenidos, los cuales se encuentran en el intervalo de 0.858 a 1.250 mmol H₂/ L-h. El valor más bajo se obtuvo al utilizar una concentración inicial de 4 g/L y el más alto con 12 g/L, por lo que con esta concentración se obtuvo la mayor TVPH.

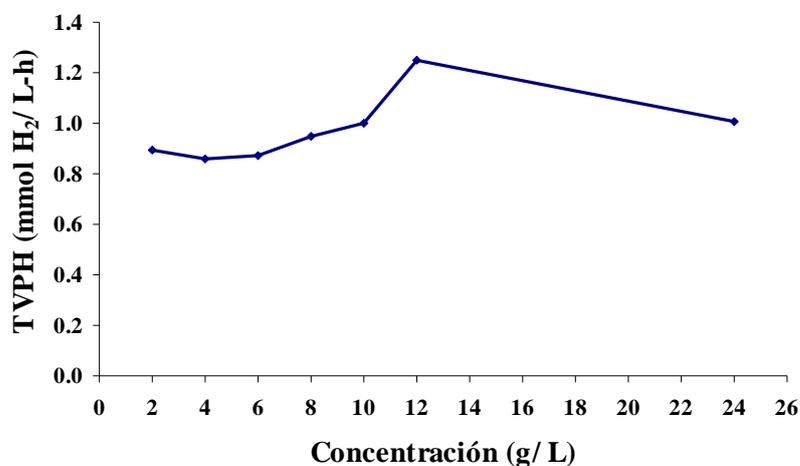


Figura 4.7. Tasa volumétrica de producción de hidrógeno (TVPH) a diferentes concentraciones de glucosa

4.3.2 Xilosa

Existen pocos reportes en la literatura relacionados con la producción de hidrógeno a partir de xilosa usando cultivos puros (Taguchi, et al., 1995; Taguchi, et al., 1994) y cultivos mixtos (Lin y Cheng, 2006; Lin, et al., 2006). Sin

embargo la fermentación de xilosa ha sido reportada ampliamente para la producción de etanol (Jin, et al., 2003; Ahring, et al., 1989; Tolan y Finn, 1987).

En base a lo anterior, se realizaron varios experimentos utilizando diferentes concentraciones de xilosa (2-24 g/L), para evaluar el efecto que tiene la concentración en la producción de hidrógeno. Las H_{max} obtenidas se encontraron en el intervalo de 51.86 a 125.93 ml de hidrógeno (Figura 4.7). Así mismo, al final del tiempo de incubación de estos experimentos el pH inicial de 5.5 disminuyó hasta valores en el intervalo de 3.3 a 4.1 (Figura 4.7). Esto último se debió a la formación de ácidos grasos volátiles durante el proceso de fermentación (Figura 4.8).

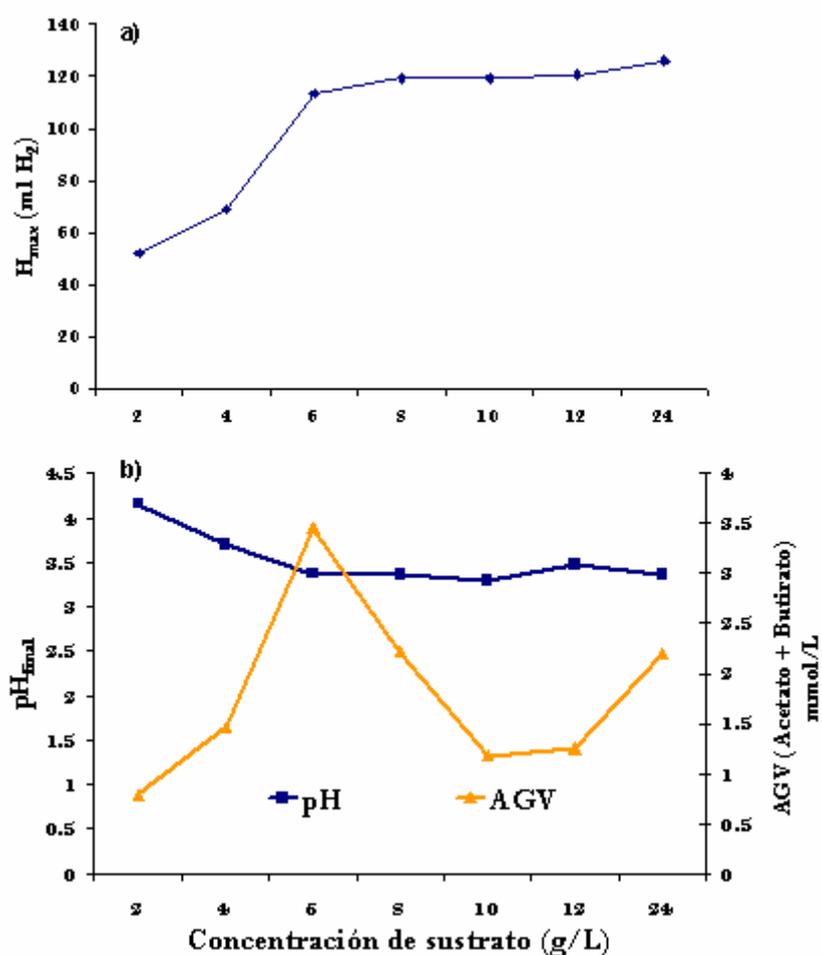


Figura 4.7. a) H_{max} y b) pH final y concentración de AGV's final en cada una de las concentraciones evaluadas de xilosa

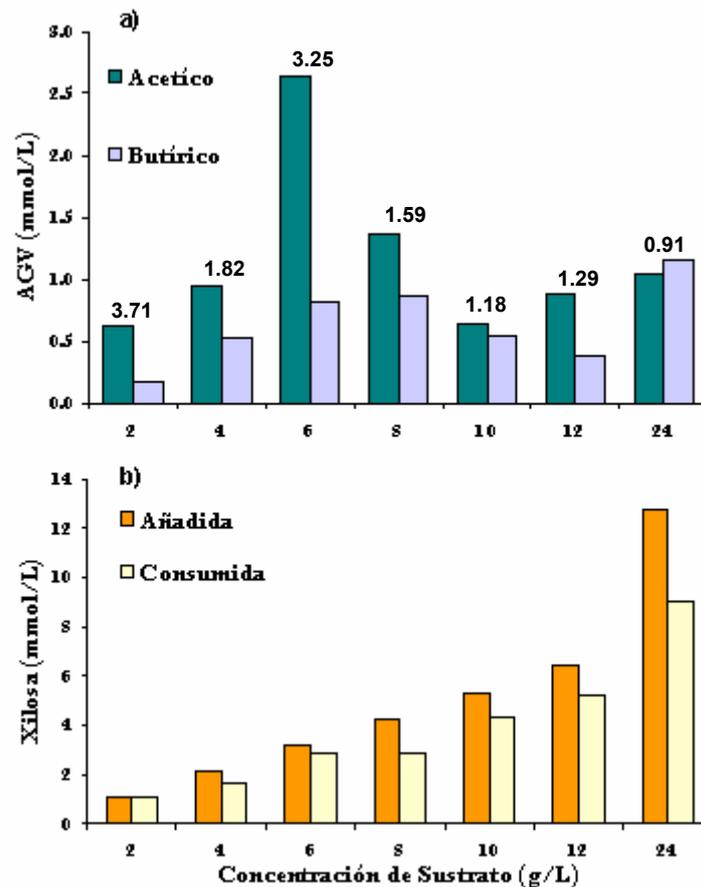


Figura 4.8. a) Concentración final de AGV y relación Acético/Butírico, y b) xilosa añadida y xilosa residual en cada uno de los experimentos

En la Figura 4.8 se muestra el perfil de AGV obtenidos para cada una de las concentraciones de xilosa ensayadas. En dicha figura se puede observar que los únicos AGV que se formaron durante el proceso de fermentación fueron acetato (0.617 a 2.640 mmoles) y butirato (0.166 a 1.148 mmol), correspondientes a concentraciones de 7.72 a 33.01 mM y 2.08 a 14.35 mM de ácido acético y ácido butírico, respectivamente. El perfil y concentración de AGV producido durante la fermentación de xilosa son semejantes a los obtenidos durante la fermentación de la glucosa descrita anteriormente. De manera similar al caso de la glucosa, las concentraciones de AGV producidos a partir de la xilosa se encuentran en el intervalo de concentraciones inhibitorias mencionado anteriormente. La relación acetato/butirato (Ac/Bu) puede variar con las condiciones del crecimiento microbiano durante el proceso de fermentación y es ampliamente utilizada para indicar el progreso de la producción de hidrógeno (Lin, et al., 2006; Khanal, et al., 2004). Las relaciones

Ac/Bu al final de la fermentación estuvieron en el intervalo de 0.91 a 3.75 y fueron dependientes de la concentración de sustrato utilizado (Figura 4.8). Por lo tanto, los cambios que se presentaron del cociente en la relación Ac/Bu se pudieron deber a una alteración metabólica, debido a los cambios ambientales tales como pH, presión parcial de hidrógeno y la acumulación de productos intermedios durante la fermentación (Khanal, et al., 2004).

Durante el proceso de fermentación, la xilosa añadida no fue consumida en su totalidad, a excepción de los experimentos realizados a una concentración de xilosa de 2 g/L,. En los experimentos donde se utilizaron concentraciones de 4 a 12 g/L, la xilosa residual estuvo alrededor del 15% mientras que para la concentración de 24 g/L, la xilosa residual fue alrededor del 28%. Por otra parte, el máximo valor de HY (Figura 4.9) obtenido varió en el intervalo de 1.35 a 1.57 mol H₂/mol xilosa_{removida}. Estos valores son mas altos que los reportados por Lin et al., (2006) usando cultivos mixtos de lodo residual (1.3 mol H₂/ mol xilosa_{removida}), lodo de una destilería (0.96 mol H₂/ mol xilosa_{removida}) y lodo del procesamiento de papel (0.55 mol H₂/ mol xilosa_{removida}).

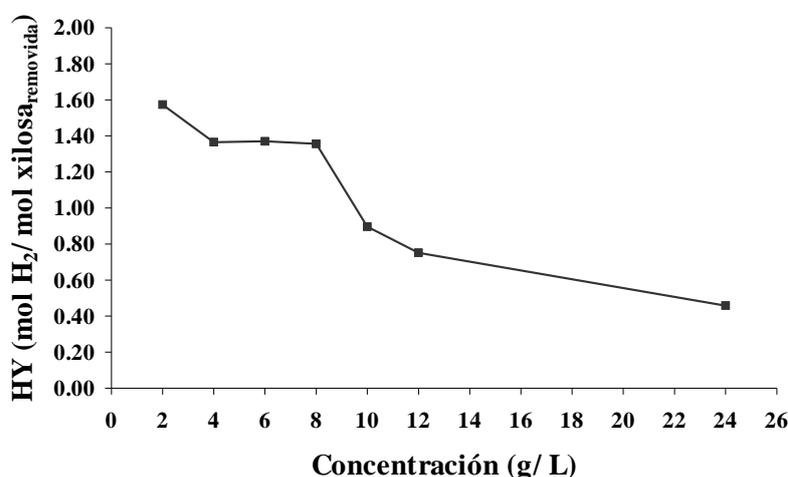


Figura 4.9. Rendimiento de hidrógeno (HY) a partir de diferentes concentraciones de xilosa

Sin embargo, conforme se incrementó la concentración desde 10 a 24 g/L de xilosa el HY fue disminuyendo hasta un valor de 0.45 mol H₂/mol xilosa_{removida}. Esta disminución se debe a que la concentración del sustrato es un factor importante que afecta la producción de hidrógeno (Lin y Cheng, 2006). Por lo

tanto, en estos resultados obtenidos la máxima concentración obtenida de ácido acético se obtuvo empleando una concentración de 6 g/L, y esta alta concentración de acetato no se encuentra asociada a una disminución del HY, a diferencia de los experimentos realizados con glucosa en donde la mayor concentración de acetato se obtuvo con la mayor concentración de glucosa empleada (24 g/L), además en los experimentos con glucosa se observa una relación entre el incremento del acetato y una disminución del HY.

Los valores obtenidos de TVPH se muestran en la Figura 4.10. En esta grafica se puede observar a claramente que la TVPH va en aumento conforme se aumenta la concentración de sustrato.

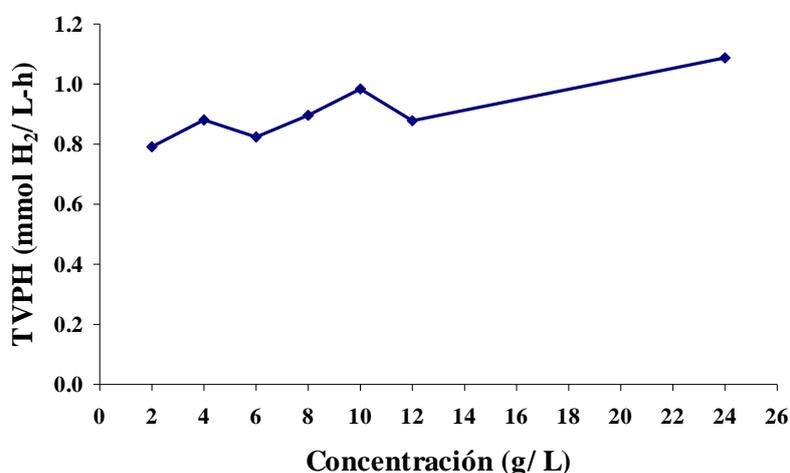


Figura 4.10. Tasa volumétrica de producción de hidrógeno (TVPH) a partir de diferentes concentraciones de xilosa

4.4 Pretratamiento ácido en los desechos agrícolas

Con el fin de extraer los azúcares presentes en la fracción de hemicelulosa de estos desechos, se realizó una hidrólisis ácido/térmica a los desechos de trigo (paja de trigo) y de maíz (paja de maíz). El análisis proximal inicial de estos desechos se muestra en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Composición proximal de los desechos agrícolas antes de la hidrólisis ácido/térmica.

	Desecho de Maíz	Desecho de Trigo
Material soluble %	36.6	22.7
Celulosa %	33.9	46.9
Hemicelulosa %	24.6	24.5
Lignina %	4.9	5.9

Se encontró que la fracción soluble, la fracción de celulosa y la de hemicelulosa representan cerca del 94% en peso de ambos desechos. Por otra parte, los dos desechos presentan una baja composición en la cantidad de lignina, menos del 6% en ambos casos.

Después de haber aplicado el tratamiento ácido/térmico, el hidrolizado o fracción líquida que contenía los productos de la hidrólisis solubles en agua, presentó una cantidad apreciable de glucosa y xilosa (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Cantidad de glucosa y xilosa obtenida a partir de la hidrólisis ácido/térmica de 100 g de desecho.

	Desecho de Maíz	Desecho de Trigo
Glucosa (g)	23.0	16.0
Xilosa (g)	4.6	0.8

Los azúcares extraídos corresponden principalmente a la fracción de hemicelulosa, como lo indican los datos de la Tabla 4.6, correspondientes al análisis proximal del material residual sólido obtenido después de la hidrólisis ácida/térmica. En dicha tabla se puede ver un incremento en la cantidad de celulosa y lignina, esto es debido a que la fracción analizada corresponde al residuo sólido que quedó después de la aplicación de la hidrólisis ácida/térmica.

Tabla 4.6. Composición proximal del material residual sólido obtenido después de la hidrólisis ácido/térmica.

	Desecho de Maíz	Desecho de Trigo
Material soluble %	23.8	19.5
Celulosa %	62.2	62.0
Hemicelulosa %	0.6	1.0
Lignina %	13.4	17.5

Como se puede apreciar en la Tabla 4.6, la fracción de hemicelulosa fue removida prácticamente en su totalidad después de la aplicación del tratamiento ácido/térmico. Por lo que el material residual sólido de ambos desechos (maíz y de trigo), en su totalidad estaba conformado por celulosa, lignina y material soluble, conteniendo una mínima fracción de hemicelulosa.

El balance del carbono orgánico total (COT) incluyendo las muestras líquidas y sólidas generadas durante la hidrólisis ácida/térmica de los desechos de maíz y de trigo se muestra en las Tablas 4.7 y 4.8. Dichas tablas muestran que se recuperó el 86.7 % y el 82.9 % del COT presente inicialmente en los desechos de maíz y trigo respectivamente. No se logró el 100% de recuperación ya que al filtrar las muestras para separar el hidrolizado líquido del material residual sólido, parte del material sólido se quedaba adherido en los filtros.

Tabla 4.7. Balance del carbono orgánico total (COT) de las fracciones (líquidas y sólidas) generadas durante la hidrólisis de los desechos de maíz. Las fracciones consideradas en el balance son las siguientes: M: desecho de maíz sin tratamiento; MAc-sólido: material residual sólido después del tratamiento ácido/térmico; MAc-líquido: Hidrolizado líquido obtenido después del tratamiento ácido/térmico; MLav1: líquido obtenido del primer lavado con agua.

Fracciones generadas a partir de 100 g de desecho de Maíz	gCOT	%
M	65.0	100.00
MAc-sólido	37.3	57.3
MAc-líquido	17.2	26.4
MLav1	1.9	2.9
Total (MAcs+MAcl+ML)	56.4	86.6

Tabla 4.8. Balance del carbono orgánico total (COT) de las fracciones (líquidas y sólidas) generadas durante la hidrólisis de los desechos de trigo. Las fracciones consideradas en el balance son las siguientes: T: desecho de trigo sin tratamiento; TAc-sólido: material residual sólido después del tratamiento ácido/térmico; TAc-líquido: Hidrolizado líquido obtenido después del tratamiento ácido/térmico; TLav1: líquido obtenido del primer lavado con agua.

Fracciones generadas a partir de 100 g de desecho de Trigo 100g	gCOT	%
T	62.4	100.00
TAc-sólido	36.2	58.0
TAc-líquido	14.7	23.5
TLav1	0.8	1.3
Total (TAcs+TAcl+TL)	51.7	82.8

4.5 Cinética de la producción de hidrógeno a partir de azúcares presentes en los hidrolizados líquidos.

Los hidrolizados líquidos de los desechos de maíz y de trigo tenían una concentración de glucosa igual a 9.1 y 6.2 g/L, respectivamente, y una concentración de xilosa igual a 1.8 y 0.3 g/L, respectivamente. Se evaluó la

producción de hidrógeno a partir de la glucosa y xilosa presentes en cada hidrolizado concentrado y en dos diluciones (1:2 y 1:4). La producción acumulativa de hidrógeno de estos experimentos se muestra en las Figuras 4.10 y 4.11. En ambos hidrolizados se presentó una fase lag muy prolongada (16-24 horas), probablemente por la presencia de inhibidores como se discute posteriormente.

La Figura 4.10 muestra que el máximo valor de H_{max} fue obtenido con el hidrolizado líquido de maíz diluido 1:2, mientras que la Figura 4.11 muestra que para el hidrolizado líquido de trigo el máximo valor de H_{max} fue obtenido con el hidrolizado sin diluir. Este resultado se puede explicar si se considera que las concentraciones de azúcares presentes en el hidrolizado líquido de trigo sin diluir y en el hidrolizado líquido de maíz diluido 1:2 son aproximadamente equivalentes.

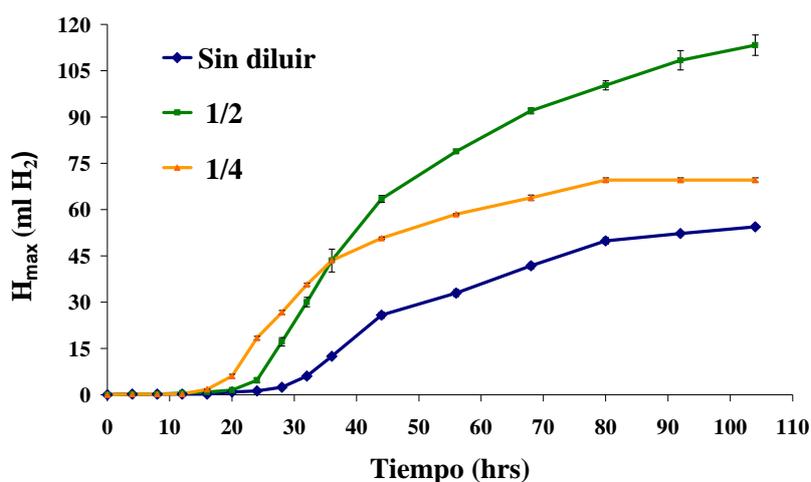


Figura 4.10. Producción acumulativa de hidrógeno a partir del hidrolizado líquido de maíz

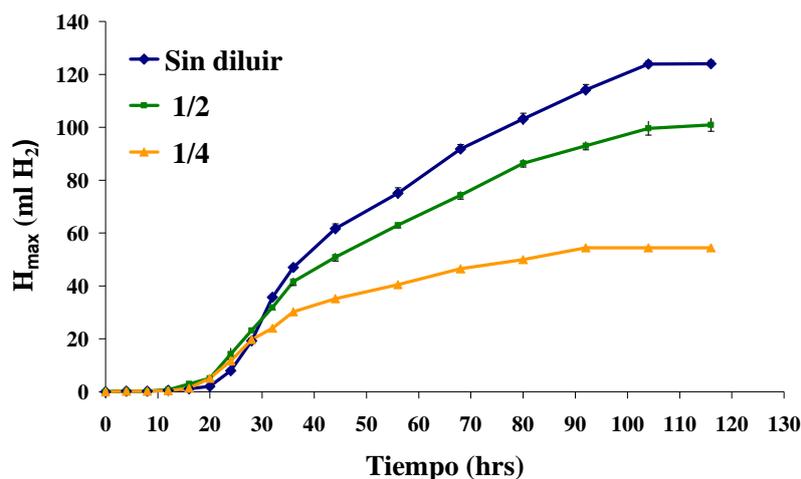


Figura 4.11. Producción acumulativa de hidrógeno a partir del hidrolizado líquido de trigo

La producción de hidrógeno a partir de los hidrolizados líquidos se debe principalmente a la fermentación de los azúcares presentes. La glucosa y xilosa fueron los únicos azúcares que se pudieron detectar por medio de electroforesis capilar. Por medio de HPLC se han detectado otros azúcares como galactosa, arabinosa y manosa en hidrolizados líquidos de maíz (Datar, 2007). Por otra parte, Curreli, et al., (2002) reportaron la presencia de glucosa y xilosa en la fracción líquida del hidrolizado ácido de trigo.

Los valores de HY obtenidos en la utilización de los dos hidrolizados líquidos se muestran en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9. HY obtenido a partir de azúcares presentes en los hidrolizados líquidos de maíz y trigo.

	Maíz (mol H ₂ /mol sustratos _{removidos})	Trigo (mol H ₂ /mol sustratos _{removidos})
Sin diluir	0.45	1.21
1:2	2.13	1.98
1:4	2.66	2.08

El mayor HY obtenido con el hidrolizado líquido de maíz fue de 2.66 mol H₂/mol sustratos_{removidos} respectivamente. Este resultado está en el intervalo de los valores reportados en la literatura (Datar, et al., 2007). Utilizando desechos de maíz como sustrato y extrayendo los azúcares presentes por medio de un

tratamiento térmico a altas presiones (steam-explosion) Datar, et al. (2007) encontraron valores para HY en el intervalo de 2.84 a 3.0 mol H₂/mol sustratos en una fermentación a pH controlado de 5.5. Para el caso del hidrolizado líquido de trigo no se encontraron reportes en la literatura acerca de la producción de hidrógeno utilizando este tipo de sustrato. El HY obtenido con los hidrolizados líquidos de trigo comparado con el obtenido con los hidrolizados líquidos de maíz es mas bajo en un 22 %.

Como se puede observar en la Tabla 4.9 los rendimientos más bajos fueron obtenidos en los hidrolizados líquidos sin diluir. Esto podría deberse, en primera instancia, a la presencia de una alta concentración de iones Cl⁻ provenientes del HCl utilizado para llevar a cabo la hidrólisis ácida/térmica. Se ha reportado que una alta concentración de iones Cl⁻ inhibe el crecimiento de las bacterias productoras de hidrógeno (Fan, et al., 2006). En segunda instancia, a la posible presencia de compuestos furfurales, como el hidroximetilfurfural (formado durante la descomposición térmica de la hemicelulosa), que puede inhibir el crecimiento de las bacterias productoras de hidrógeno (Palmqvist y Hägerdal, 2000).

Por otra parte, las TVPH obtenidas en la fermentación de los hidrolizados líquidos de maíz y de trigo se muestran en las Tabla 4.10. El máximo valor de TVPH obtenido para el hidrolizado líquido de maíz fue de 5.94 (mmol H₂/ L-h) y para el hidrolizado de trigo fue de 0.92 (mmol H₂/ L-h). Estos valores se obtuvieron con el hidrolizado líquido sin diluir para ambos casos. Aclarando que la obtención del valor de 5.89 mmol H₂/ L-h se pudo deber a que la ecuación de Gompertz no se ajusto con los datos obtenidos. Por otra parte, no se ha reportado TVPH en la literatura utilizando este tipo de sustrato.

Tabla 4.10. TVPH obtenido a partir de azúcares presentes en los hidrolizados líquidos de maíz y trigo.

	Maíz (mmol H ₂ /L-h)	Trigo (mmol H ₂ /L-h)
Sin diluir	5.94	0.92
1:2	1.11	0.71
1:4	0.89	0.53

La concentración de AGV formados durante el proceso de fermentación del hidrolizado líquido de maíz se muestra en la Tabla 4.11. En esta tabla se puede observar que en los experimentos donde se utilizó el hidrolizado líquido sin diluir el metabolito formado en mayor proporción fue el ácido butírico. Sin embargo, en los experimentos donde se emplearon diluciones de los hidrolizados líquidos el mayor metabolito formado fue el ácido acético. Las concentraciones del ácido butírico determinadas en cada uno de los experimentos se encuentran en el intervalo que se ha reportado como inhibitorio para la producción de hidrógeno (Van Ginkel, et al., 2005).

Tabla 4.11. Concentración de AGV generados en la fermentación del hidrolizado líquido de maíz para producir hidrógeno.

	Acético (mM)	Butírico (mM)
Sin diluir	18.1	26.9
1:2	14.1	13.6
1:4	12.0	11.6

Por otra parte, en la Tabla 4.12 se muestran las concentraciones de AGV producidas durante el proceso de fermentación del hidrolizado líquido de trigo. En este caso, los subproductos formados son acetato, butirato y propionato. A diferencia de los metabolitos formados durante la fermentación de los hidrolizados líquidos de maíz, en estos experimentos se observó formación de propionato cuando se utilizó el hidrolizado líquido sin diluir. Una posible explicación para la formación de este metabolito podría ser que debido a la alta concentración de azúcares se originara una alta presión parcial de hidrógeno según lo reportado por McCarty y Mosey, (1991).

Tabla 4.12. Concentración de AGV generados en la fermentación del hidrolizado líquido de trigo para producir hidrógeno.

	Acético (mM)	Butírico (mM)	Propiónico (mM)
Sin diluir	15.2	12.7	14.0
1:2	10.2	7.8	0.0
1:4	5.0	1.8	0.0

Debido a que el pH es el parámetro que determina la ruta anaerobia hacia butirato, propionato o en su defecto hacia acetato, al final de la fermentación de

ambos hidrolizados se midió el pH, y se observó una disminución hasta 3.3 a 3.6 para ambos hidrolizados.

Kim, et al., (2004), reportan una acumulación de propionato en experimentos en lote, donde menciona que la acumulación de este metabolito es afectada por la presión parcial de hidrógeno. Por otra parte el butirato es acumulado debido a dos factores esencialmente, una alta presión parcial de hidrógeno y bajo pH. McCarty (1991) sugiere un modelo para la ruta de la acidogénesis anaerobia, donde menciona una conexión entre las bacterias productoras de ácido propiónico y butírico. Para esto propone dos hipótesis: (1) las bacterias productoras de propionato no son afectadas por la presión parcial de hidrógeno y crecen rápidamente a un pH neutro y a una alta concentración de sustrato, (2) las bacterias productoras de butirato son productoras de hidrógeno y son bacterias tolerantes a la acidez. En base a esto se puede suponer que la producción de hidrógeno esta ligada a la producción de butirato y no a la producción de propionato.

La relación de la concentración de butirato y acetato (Ac/Bu) es usada frecuentemente para indicar la evaluación de la eficiencia de la producción de hidrógeno usando cultivos mixtos (Kim et al., 2006). Los cocientes obtenidos con los hidrolizados líquidos de maíz y de trigo se muestran en la Tabla 4.13. En donde se puede observar que a partir de la obtención de un mayor cociente el rendimiento es alto, debido a que la ruta metabólica se va hacia la producción de ácido acético y por lo tanto se obtiene una mayor producción de hidrógeno, en contraste cuando se obtiene un bajo cociente se puede observar que el rendimiento disminuye debido a que la ruta metabólica se va hacia la producción de ácido butírico y por lo tanto la producción de hidrógeno disminuye.

Tabla 4.13. Cociente Ac/Bu obtenido a partir de la concentración de AGV producidos durante la fermentación de los hidrolizados.

	Maíz	Trigo
Sin diluir	0.67	1.19
1:2	1.03	1.29
1:4	1.03	2.73

4.6 Cinética de la producción de hidrógeno a partir de desechos de maíz y de trigo.

En la Figura 4.12 y 4.13 se muestran la producción acumulativa de hidrógeno a partir de los desechos sin tratar de maíz y de trigo utilizando ensilado de Rye grass como inoculó para la fermentación. Estos experimentos fueron efectuados a pH 5.5 y con una concentración en el intervalo de 5 a 25 g SVT en ambos casos. Como se puede observar en las Figuras 4.12 y 4.13 al aumentar la concentración de sustrato para ambos casos, la producción máxima de hidrógeno disminuye. También se puede observar que la cantidad de hidrógeno producido a partir del desecho de maíz fue casi el doble que la producida a partir de desecho de trigo.

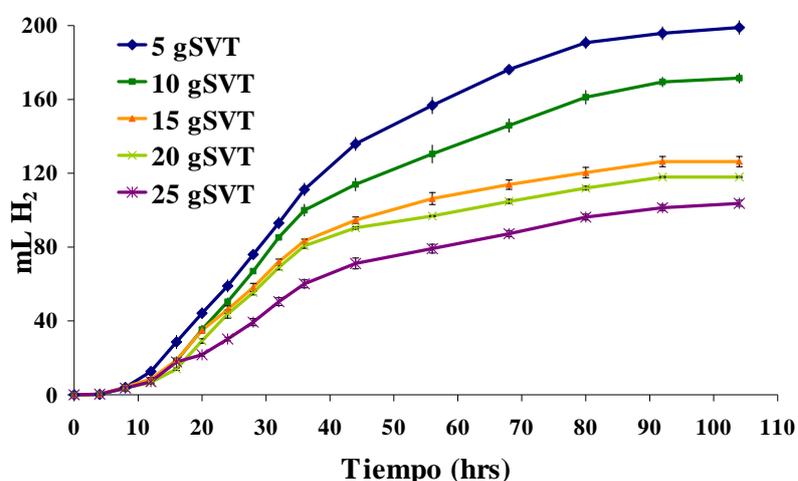


Figura 4.12. Producción acumulativa de hidrógeno a partir de desecho de maíz

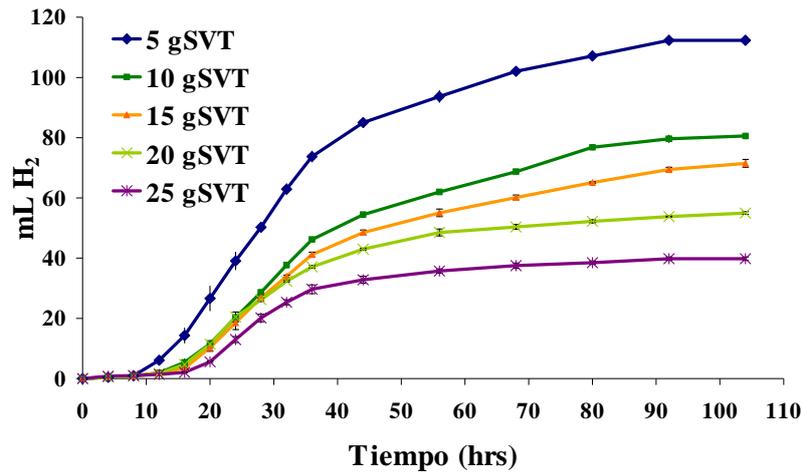


Figura 4.13. Producción acumulativa de hidrógeno a partir de desecho de trigo

Esta gran diferencia en la producción de hidrógeno puede deberse a dos factores: (1) el desecho de maíz contiene una mayor cantidad de material soluble (36.6 %) que el desecho de trigo (22.7 %), siendo esta fracción en donde se encuentran azúcares simples que son fácilmente fermentables, (2) la hemicelulosa presente en el desecho de maíz es más fácilmente biodegradable que aquella presente en el desecho de trigo.

Los valores de HY obtenidos en la producción de hidrógeno utilizando los dos desechos bajo estudio se muestra en las Figuras 4.14 y 4.15. En dichas figuras se puede observar que los rendimientos disminuyeron conforme fue aumentando la concentración del sustrato. Los valores de HY que se obtuvieron en el caso del desecho de maíz se encuentran en el intervalo de 146.06 a 33.74 ml H₂/g SV_{removido} mientras que para el desecho de trigo se encuentran en el intervalo de 81.91 a 15.96 ml H₂/g SV_{removido}. Zhang, et al., (2007) reportaron un valor máximo de HY de 149.7 ml/g SV utilizando desecho de maíz, pretratado con ácido, y efectuando la fermentación a un valor inicial de pH 7 y una concentración de sustrato de 15 g SV/L. Por otra parte, Fan, et al. (2006) reportaron un HY máximo de 68.1 ml H₂/g SVT utilizando desechos de trigo pretratados con una solución ácida, empleando un valor de pH inicial de 7 y una concentración de sustrato de 25 g SVT.

La diferencia entre los valores de HY reportados en la literatura en comparación a los obtenidos en nuestro estudio se puede deber a dos factores: (1) la presencia de iones Cl^- provenientes del pretratamiento de los sustratos empleado por Zhang, et al. (2007) y Fan, et al. (2006), (2) la utilización de un valor de pH de 7 el cual podría no ser óptimo para llevar a cabo el proceso de fermentación.

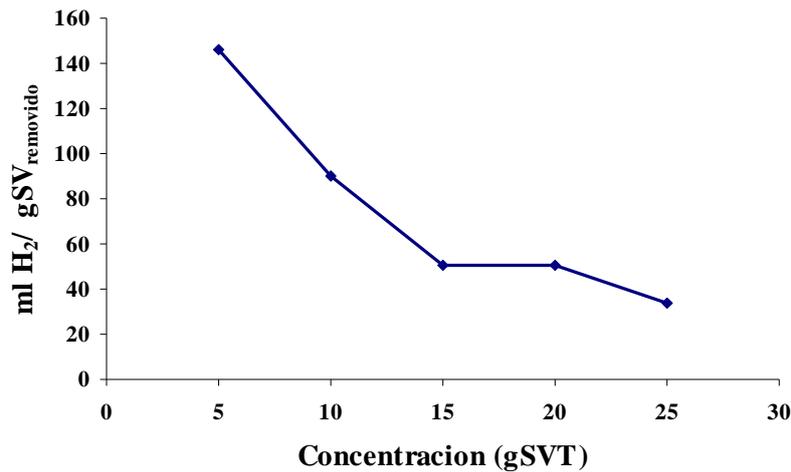


Figura 4.14. Rendimiento de hidrógeno (HY) obtenido en la producción de hidrógeno a partir de desecho de maíz.

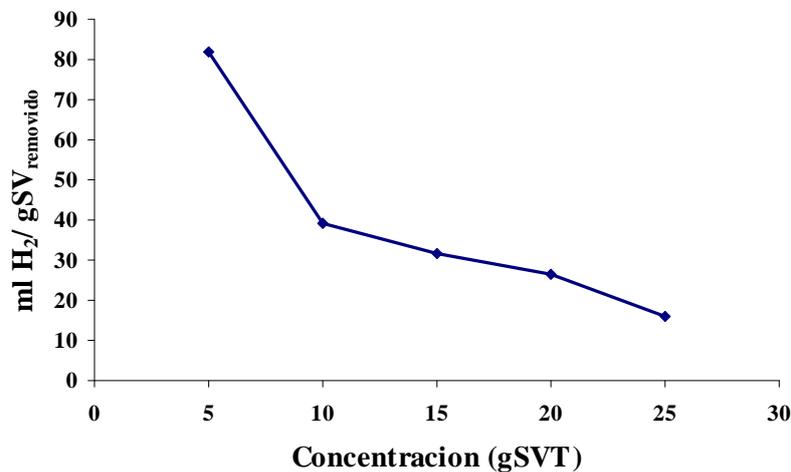


Figura 4.15. Rendimiento de hidrógeno (HY) obtenido en la producción de hidrógeno a partir de desecho de trigo.

Los valores de TVPH obtenidos en los experimentos efectuados con los desechos sin tratar son mostrados en las Figuras 4.16 y 4.17. Se puede observar un comportamiento similar al presentado para HY; los valores mas

altos obtenidos para TVPH fueron de 1.746 y 1.241 mmol H₂/L-h para los desechos de maíz y de trigo, respectivamente. Por lo tanto, la concentración del sustrato en estos experimentos afecta tanto al rendimiento como a TVPH. Las Figuras 4.18 y 4.19 muestran que a una concentración alta de sustrato se produjo una cantidad mayor de AGV's, lo cual resulta inhibitorio para el proceso de fermentación.

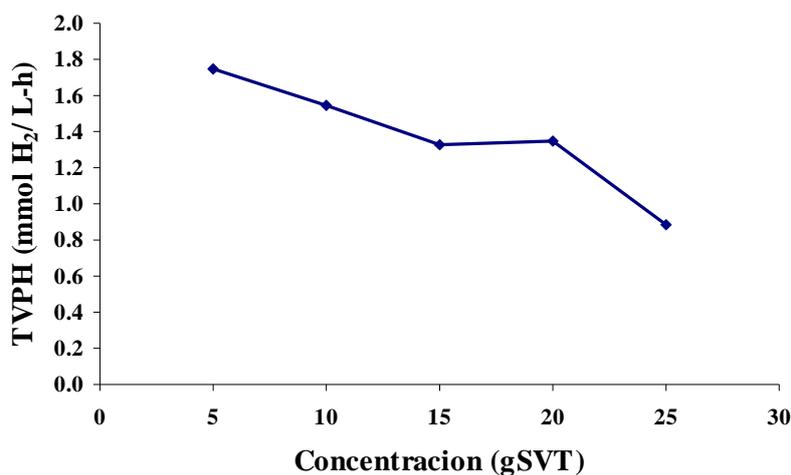


Figura 4.16. TVPH obtenida en la producción de hidrógeno obtenida a partir de desechos de maíz

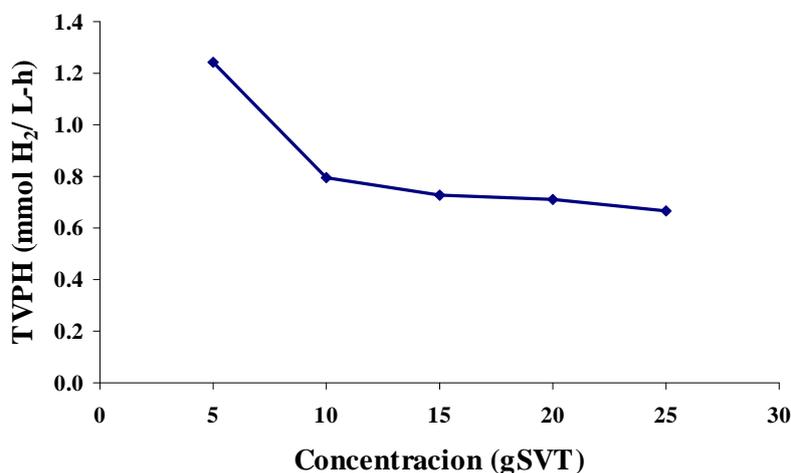


Figura 4.17. TVPH obtenida en la producción de hidrógeno obtenida a partir de desechos de trigo

En estas Figuras 4.18 y 4.19 se puede observar que para ambos casos el acetato fue el metabolito que se encontró en mayor concentración, seguido del butirato y en menor proporción de propionato. La cantidad total de los

metabolitos producidos en mmoles durante la fermentación de los desechos de maíz se encontraron en el intervalo de 1.145 a 2.504 para acetato, 0.516 a 1.267 para butirato y de 0.167 a 0.253 para propionato, mientras que para el desecho de trigo se encontraron el intervalo de 0.701 a 2.163 para acetato, 0.473 a 1.122 para butirato, y de 0.149 a 0.191 para propionato. Una posible explicación de la formación de propionato en estos experimentos pudiera deberse a fuentes de nitrógeno alternativas presentes en los desechos agrícolas, ya que según lo reportado por Dworkin (2006) se observo un aumento en la producción de propionato a partir de una bacteria productora de propionato en presencia de fuentes complejas de nitrógeno (extracto de levadura y licor de molienda de maíz).

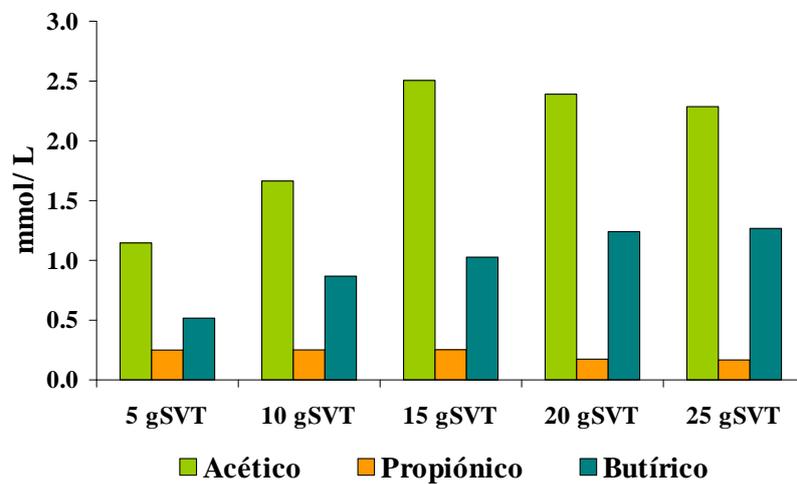


Figura 4.18. Concentración de AGV's en la fermentación de desecho de maíz

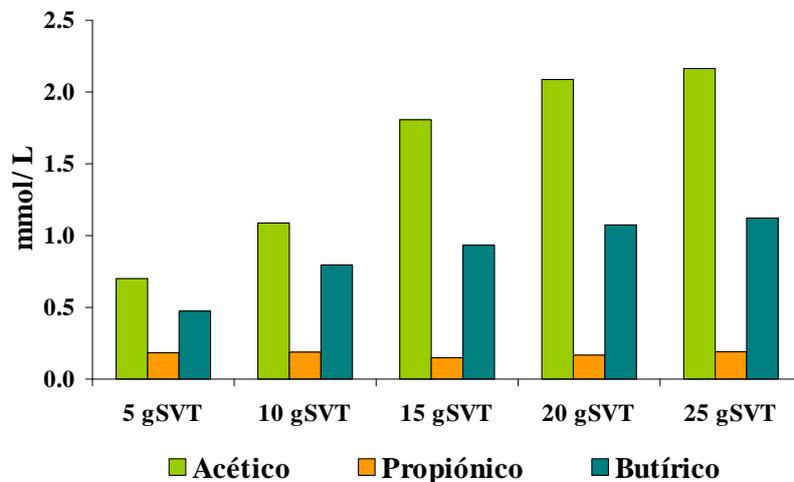


Figura 4.19. Concentración de AGV's en la fermentación de desecho de trigo

En la Tabla 4.14 se muestran los cocientes acético/butírico obtenidos durante el proceso de fermentación utilizando los desechos de maíz y de trigo como sustrato.

Tabla 4.14. Cociente Ac/Bu obtenido a partir de la concentración de AGV's producidos durante la fermentación de los desechos.

Cantidad de desecho	Maíz	Trigo
5 g SVT	2.2	1.4
10 g SVT	1.9	1.3
15 g SVT	2.4	1.9
20 g SVT	1.9	1.9
25 g SVT	1.8	1.9

Con el propósito de determinar si el proceso de hidrólisis ácida facilitó el proceso de producción de hidrógeno se calcularon tanto los rendimientos obtenidos con los hidrolizados líquidos así como aquellos obtenidos con los desechos sin tratar. Los rendimientos se calcularon en base a los gramos (base seca) de desecho añadido inicialmente y se reportaron como $\text{ml H}_2/\text{g}_{\text{desecho}} \text{añadido}$. En la Tabla 4.15 se muestran las comparaciones entre dichos rendimientos. Como se puede observar, los mayores rendimientos obtenidos a partir del sustrato añadido se obtuvieron con los hidrolizados líquidos tanto de maíz como de trigo, en comparación a los rendimientos obtenidos con los desechos sin tratar. Este aumento en los rendimientos se debió a que la hidrólisis química aplicada a cada uno de los desechos, solubilizó los azúcares presentes en la fracción de hemicelulosa. Por lo tanto, se obtuvo un mayor rendimiento en la producción de hidrógeno a partir de dichos azúcares. Hay que hacer notar que este aumento en el rendimiento con los hidrolizados líquidos no se observó en todos los casos, ya que en los experimentos donde se utilizó el hidrolizado líquido de maíz sin diluir el rendimiento fue menor al que se obtuvo con los desechos sin tratar. Una posible explicación a esto es el efecto de algunos componentes (furfurales por ejemplo) que se hayan formado durante el proceso de la hidrólisis ácida y que podrían tener un efecto inhibitorio sobre los microorganismos productores de hidrógeno.

En base a los rendimientos mostrados en la Tabla 4.15, también se puede concluir que la utilización de desecho de maíz como sustrato para la producción de hidrógeno, tanto en los hidrolizados líquidos como en la utilización del desecho sin tratar, produce un mayor rendimiento que el desecho de trigo.

Tabla 4.15. Comparación de los rendimientos calculados en base a cantidad (base seca) de desecho añadido obtenidos con los hidrolizados líquidos y los desechos sin tratar.

	Desecho de maíz	Desecho de trigo
	(ml H₂/g desecho añadido)	
Hidrolizado líquido sin diluir	11.5	31.0
Hidrolizado líquido diluido 1:2	54.5	50.5
Hidrolizado líquido diluido 1:4	68.0	53.1
Desecho sin tratar	33.7	18.2

Los cálculos del rendimiento para los experimentos con hidrolizado líquido se realizaron en base a gramos (base seca) de desecho añadido (ml H₂/ g desecho añadido) considerando: 1) se emplearon 40 g del desecho agrícola para preparar 800 ml del hidrolizado líquido, 2) cada botella de los experimentos en lote tenía 80 ml de hidrolizado. Por lo tanto cada botella de los experimentos en lote contenía azúcares solubilizados provenientes de 4 g de desecho para el caso del hidrolizado líquido sin diluir, 2 g en el caso de la dilución 1:2 y 1 g en el caso de la dilución 1:4. Por otra parte, los cálculos del rendimiento para los experimentos con los desechos completos sin tratar se realizaron considerando los gramos del desecho añadido (en base seca) a cada botella.

Capítulo V. Conclusiones y perspectivas

- 1) El inóculo proveniente del ensilado de Rye grass fue mejor que el inóculo proveniente del ensilado de rastrojo de maíz y olote porque presentó mayor rendimiento y tasa de producción de hidrógeno. Las condiciones óptimas para la producción de hidrógeno utilizando el inóculo proveniente del ensilado de Rye grass son:
 - a. Valor inicial de pH en el intervalo de 5.5 y 6.5
 - b. La cantidad de 120 esporas totales
 - c. Temperatura en el rango mesofílico

- 2) La adición de hierro al medio mineral propuesto por Van Ginkel proporcionó un aumento en el rendimiento y la tasa de producción de hidrógeno, empleando el inóculo proveniente del ensilado de Rye grass.

- 3) En los experimentos de producción de hidrogeno con los sustratos modelo los metabolitos formados durante la fermentación fueron solamente acetato y butirato. En cambio cuando se empleo el hidrolizado de trigo y los dos desechos sin tratar como sustratos, se produjo propionato además de acetato y butirato.

- 4) En los experimentos donde se emplearon como sustrato los hidrolizados líquidos de maíz y de trigo se observo un efecto inhibitorio, que se reflejó en una fase lag prolongada.

- 5) Se encontró un mayor rendimiento de solubilización de glucosa y xilosa a partir del desecho de maíz después de aplicar una hidrólisis ácida/térmica en comparación con el obtenido con el desecho de trigo.

- 6) El rendimiento máximo obtenido con los sustratos modelo (glucosa y xilosa) fue muy similar para ambos casos. La tasa volumétrica de producción de hidrógeno fue ligeramente mayor en los experimentos con glucosa.

- 7) El rendimiento y la tasa volumétrica de producción de hidrógeno (valores máximos) obtenidos con el hidrolizado líquido de maíz fueron mayores que los obtenidos con el hidrolizado líquido de trigo. Esto mismo se observó en el caso de la producción de hidrógeno a partir de ambos desechos sin tratar.

- 8) Los rendimientos calculados en base a la cantidad inicial de desecho indicaron que hubo un incremento en el rendimiento de la producción de hidrógeno a partir de los hidrolizados líquidos de los desechos agrícolas bajo estudio, en comparación con el rendimiento obtenido con los desechos sin tratar. Esto último apoya que la hipótesis planteada es correcta.

Perspectivas a futuro

A manera de recomendación se sugiere lo siguiente para continuar con la investigación sobre este tema:

- a) Optimización del proceso de hidrólisis en los desechos agrícolas:
 - a. Cantidad del material empleado
 - b. Tiempo de contacto
 - c. Concentración del ácido
 - d. Temperatura empleada
- b) Implementar métodos para la solubilización de celulosa presente en los desechos agrícolas después de la hidrólisis ácida.
 - a. Químicos
 - b. Enzimáticos
- c) Estudiar la producción de hidrógeno a partir de mezclas de hidrolizados de diferentes desechos agrícolas.
- d) Estudiar la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados de desechos agrícolas en reactores:
 - a. Configuración del reactor:
 - i. Completamente agitado
 - ii. Con biomasa granulada

- iii. Con biopelícula
 - iv. En dos fases (fermentativo-metanogénico)
- b. Optimización de las condiciones operacionales

Referencias bibliográficas

- Andaloussi, S. A., Amine, J., Gerard, P. y Petitdemanage, H. 1998. Effect of glucose on glycerol metabolism by *Clostridium butyricum* DSM 5431. J. of Applied Microbiology. 84: 515-522
- Anderson, E. y Krznarich, P. W. 1935. Hemicellulose from oat hulls. Journal of Biological Chemistry. 549-552.
- Ahring, B. K., Jensen, K., Nielsen, P., Bjerre, A. B. y Schmid, A. S. 1989. Pretreatment of wheat straw and conversion of xylose and xylan to ethanol by thermophilic anaerobic bacteria. Bioresearch Technol. 58:107-13.
- Angenent, L. T., Karim, K., Al-Dahhan, M. H., Wrenn, B. A. y Espinosa, D. R. 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. Trends in Biotechnology. 22(9): 477-485.
- American Public Health Association. 1998. Total, fixed and volatile solids in solid and semisolid samples. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th Edition. Pag. 2-59.
- Bahl, H., W. Andersch, K. Braun, y G. Gottschalk. 1982. Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14: 17-20.
- Bisaillon, A., Turcot, J. y Hallenbeck, P. C. 2006. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. Int. J. Hydrogen Energy. 31(11): 1504-1508.
- Boerjan, W., Ralph, J. y Baucher, M. 2003. Lignin Biosynthesis. Annu. Rev. Plant Biol. 54: 519-46.
- Boone, D. y Xun, L. 1987. Effects of pH, temperature and nutrients on propionate degradation by methanogenic enrichment culture. Applied and Environmental Microbiology. 53: 1589-1592.
- Campos, R. M. y de la Torre, M. 2002. Production of propionate by fed-batch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* using mixed feed of lactate and glucose. Biotechnology Letters. 24: 427-431.
- Chang, F. Y. y Lin, C. Y. 2004. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. Int J Hydrogen Energy. 29: 33-39.
- Chen, X. Sun, Y. Xiu, Z. L. Li, X. y Zhang, D. 2006a. Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. Int. J. Hydrogen Energy. 31: 539-549.
- Chen, W. H., Chen, S. Y., Khanal, S. K. y Sung, S. 2006b. Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. Int J Hydrogen Energy. 31(15): 2170-2178.
- Chen, W. M., Tseng, Z. J., Lee, K. S. y Chang, J. S. 2005. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. Int J Hydrogen Energy. 30(10): 1063-1070.
- Chen, C. C., Lin, C. Y. y Chang, J. S. 2001. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as limiting substrate. Appl Microbiol Biotechnol. 57: 56-64.
- Cheong, D. Y. y Hansen, C. L. 2006. Acidogenesis characteristics of natural mixed anaerobes converting carbohydrate-rich synthetic wastewater to hydrogen. Process Biochem. 41(8): 1736-1745.
- Chiaromonti, D. 2007. Bioethanol: role and production Technologies. Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses. Springer Netherlands.
- Coen, J. A. y Dehority, B. A. 1970. Degradation and utilization of hemicellulose from intact forages by pure cultures of rumen bacteria. Applied Microbiology. 362-368

- Collet, Ch., Girbal, L., Péringer, P., Schwitzguébel, J. P. y Soucaille, P. 2006. Metabolism of lactose by *Clostridium thermolacticum* growing in continuous culture. Arch. Microbiol. 185: 331–339.
- Collet, C., Adler, N., Schwitzguébel, J. P. y Péringer, P. 2004. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. Int J Hydrogen Energy. 29: 1479–1485.
- Currelli, N., Agelli, M., Pisu, B., Rescigno, A., Sanjust, E. y Rinaldi. 2002. Complete and efficient enzymic hydrolysis of pretreated wheat straw. Process Biochemistry. 37: 937-941.
- Dabrock, B., Bahl, H., Gottschalk, G. 1992. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurium*. Appl Environ Microbiol. 58: 1233–1239.
- Datar, R., Huang, J., Maness, P. C., Mohagheghi, A., Czernik, S. y Chornet, E. 2007. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. Int J Hydrogen Energy. 32: 932-939.
- Dávila-Vazquez, G., Arriaga, S., Alatríste-Mondragon, F. Rodríguez, de L. A., Colunga, R. L. M. y Razo-Flores, Elias. 2007. Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. Rev Environ Sci Biotechnol. DOI 10.1007/s11157-007-9122-7.
- Deckwer, W. D. 1995. Microbial conversion of glycerol to 1,3- propanediol. FEMS Microbiol Rev. 16: 143–149.
- Dumitriu, S. 2005. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. Marcel Dekker, Inc.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. y Stackebrandt, E. 2006. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. Springer Science Business Media, Inc.
- Evvyernie D, Morimoto K, Karita S, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K. 2001. Conversion of chitinous waste to hydrogen gas by *Clostridium paraputrificum* M-21. J Biosci Bioeng. 91:339–43.
- Fang, H. H. P. y Liu, H. 2002. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. Bioresource Technology. 82: 87-93.
- Fan, Y. T., Zhang, Y. H., Zhang, S. F., Hou, H. W. y Ren, B. Z. 2006. Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. Bioresource Technology. 97: 500-505.
- Ferchichi, M., Crabbe, E., Gil, G. H., Hintz, W. y Almadidy, A. 2005 Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. J Biotechnol 120(4): 402–409.
- Gerardi, M. H. 2003. The microbiology of anaerobic digesters. John Wiley & Sons.
- Hallenbeck, P. C. y Benemann, J. R. 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes, Int J Hydrogen Energy. 27: 1185-1193.
- Harley, P. 2002. Laboratory Exercises in microbiology. Fifth edition. McGraw-Hill.
- Hartmanis, M. G. N. y Gatenbeck, S. 1984. Intermediary metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: levels of enzymes involved in the formation of acetate and butyrate. Applied and Environmental Microbiology. 47: 1277-1283.
- Jin, Y. S., Ni, H. Laplaza, J. M. y Jeffries, T. W. 2003. Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate d-xylulokinase activity. Appl Environ Microbiol. 69: 495–503.
- Jones, D. T. y Woods, D. R. 1986. Acetona-Butanol fermentation revisited. Microbiological Reviews. 50: 484-524.
- Jördening, J. H. y Winter, J. 2005. Environmental Biotechnology. Bacterial metabolism in wastewater treatment systems. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 1-48.
- Kahanal, S. K., Chen, W. H., Li, L. y Sung, A. 2004. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. Int J Hydrogen Energy. 29: 1123-1131.
- Kawagoshi, Y., Hino, N., Fujimoto, A., Nakao, M., Fujita, Y., Su-gimura, S. y Furukawa, K. 2005. Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. J Biosci Bioeng. 100(5): 524–530.

- Kim, D. H., Han, S. K., Kim, A. H. y Shin, H. S. 2006. Effect of gas saparging on continuous fermentative hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*. 31: 2158-2169.
- Kim, I. S., Hwang, M. H., Jang, J. N., Hyun, S. H. Lee, S. T. 2004. Effect of low pH on activity of hydrogen utilizing methanogen in biohydrogen process. *Int J Hydrogen Energy*. 29: 1133-1140.
- Kirk, T. K. y Farrell, R. L. 1987. Enzymatic "Combustion": The microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 465-505.
- Kirk, T. K. 1971. Effects of microorganisms on lignin. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 185-210.
- Karakashev, D., Thomsen, A. B. y Angelidaki, I. 2007. Anaerobic biotechnological approaches for production of liquid energy carriers from biomass. *Biotechnol Lett.* 29:1005–1012.
- Khanal, S. K, Chen, W. H., Li, L., Sung, S. 2004. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *Int J Hydrogen Energy*. 29: 1123–1131.
- Kremers, R. E. 1959. The Lignins. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 10: 185-196.
- Kumar, N. y Das, D. 2001. Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as soil materices. *Enz Microb. Techonol.* 29: 280-287.
- Kumar, N. y Das, D. 2000. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochem* 35:589-94.
- Ladisich, M. R., Lin, K. W., Voloch, M. y Tsao, G. T. 1983. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 5: 82-102.
- Lay, J. J., Van Ginkel, S. y Sung, S. 2001. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ Sci Technol.* 35: 4726-4730.
- Lay, J. J. 2000. Modelling and optimizations of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnol. Bioeng* 68(3):269-278.
- Lay, J. J., Lee, Y. J. y Noike, T. 1999. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Res.* 33: 2579–2586.
- Levin, D. B., Islam, R., Cicek, N. y Sparling, R. 2006. Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *Int. J. Hydrogen Energy*. 31: 1496-1503.
- Li, D. y Chen, H. 2007. Biological hydrogen production from steam-exploded straw by simultaneous saccharification and fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy*. 32: 1742-1748.
- Lin, Ch. Y. y Cheng, Ch. H. 2006. Fermentative hydrogen production from xylose using anaerobic mixed microflora. *Int. J. Hydrogen Energy*. 31: 832-840.
- Lin, Y. Ch., Hung, Ch. H. Chen, Ch. H. Chung, W. T. y Cheng, L. H. 2006. Effects of initial cultivation pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures. *Process Biochemistry*. 41: 1383-1390.
- Lin, C. Y. y Lay, C. H. 2005. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*. 30: 285-292.
- Lin, C. Y., y Chang, R. C. 2004. Fermentative hydrogen production at ambient temperature. *Int J Hydrogen Energy*. 29: 715–720.
- Lin, C. Y. y Lay, C. H. 2004. Carbon/nitrogen ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *Int J Hydrogen Energy*. 29: 41–45.
- Lin, C. Y., y Chang, R. C. 1999. Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. *J. of Chemical Technology and Biotechnology*. 74: 498-500.
- Liu, X., Zhu, Y. y Yang, S. T. 2006. Butyric acid and hydrogen production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 and mutants. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 521-528.
- Liu, G. y Shen. J. 2004. Effects of culture medium and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. *J Biosci Bioeng* 98: 251–256.

- Liu, H., Zhang, T. y Fang, H. P. P. 2003. Thermophilic H₂ production from cellulose containing wastewater. *Biotechnol Lett.* 25:365–369.
- Logan, B. E., Oh, S. E., Kim, I. S. y Van Ginkel, S. 2002. Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environ Sci Technol.* 36(11): 2530–2535.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H. y Pretorius, I. S. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 66: 506–577.
- Mazzocchia, C., Kaddouri, A., Modica, G. y Nannicini, R. 2006. Fast Synthesis of Biodiesel from Triglycerides in Presence of Microwaves. *Advances in Microwave and Radio Frequency Processing.* Springer Berlin Heidelberg.
- McCarty, P. L., Mosey, F. E. 1991. Modelling of anaerobic digestion processes (a discussion of concepts). *Water Sci Technol.* 24(8):17–33.
- Mckee, T. y Mckee, J. R. 2003. *Bioquímica. La base molecular de la vida.* Mc-Graw Hill. Tercera edición.
- Meng Ni, Leung, D. Y. C. D., Leung, K. H. M., Sumathy, K. 2006. An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Processing Technology.* 87: 461-472.
- Mizuno, O., Ohara, T., Shinya, M. y Noike, T. 2000. Characteristics of hydrogen production from bean curd manufacturing waste by anaerobic microflora. *Water Science and Technology.* 42: 345-350.
- Morimoto, M., Atsuko, M., Atif, A. A. Y., Ngan, M. A., Fakhrúl-Razi, A. y Iyuke, S. E. 2004. Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. *Int J Hydrogen Energy.* 29: 709–713.
- Morrison, T. R. y Boyd, N. R. 1985. *Química Orgánica.* Fondo Educativo Interamericano. Segunda edición.
- Mu, Y., Wang, G. y Yu, H. Q. 2006a. Response surface method logical analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. *Enzyme Microb Technol* 38(7): 905–913.
- Mu, Y., Wang, G. y Yu, H. Q. 2006b. Kinetic modelling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. *Bioresource Technology.* 97: 1302-1307.
- Nath, K. y Das, D. 2004. Hydrogen by dark fermentation-current perspective. 15th World Hydrogen Energy Conference, June 27-July 2, Yokohama, Japan.
- Norkrans, B. 1963. Degradation of cellulose. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1: 325-350.
- Norman, A. G. 1941. Chemistry of the carbohydrates and glycosides. *Annu. Rev. Biochem.* 10: 65-90.
- Oh, Y. K., Seol, E. H., Kim, J. R. y Park, S. 2003a. Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y 19. *Int J Hydrogen Energy* 28: 1353-1359.
- Oh, S. E., Van Ginkel, S. y Logan, B. E. 2003b. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environ Sci Technol.* 37(22): 5186–5190.
- Palmqvist, E. y Hägerdal, H. B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology.* 74: 25-33.
- Park, W., Hyun, S. H., Oh, S-E., Logan, B. E. y Kim, I. S. 2005. Removal of headspace CO₂ increases biological hydrogen production. *Environ. Sci. Technol.* 39: 4416-4420.
- Pimentel, D. y Patzek, T. W. 2005. Ethanol Production Using Corn, Switchgrass, and Wood; Biodiesel Production Using Soybean and Sunflower. *Natural Resources Research.* 14: 65-76.
- Ren, N., Li, J., Li, B., Wang, Y. y Liu, S. 2006. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. *International Journal of Hydrogen Energy* 31: 2147-2157.
- Ross, P., Mayer, R. y Benziman. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews.* 55: 35-58.

- Salerno, M. B., Park, W., Zuo, Y. y Logan, B. E. 2006. Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water Res.* 40(6): 1167–1172.
- Salis, A., Monduzzi, M. y Solinas, V. 2007. Use of lipases for the production of biodiesel. *Industrial Enzymes* doi: 10.1007/1-4020-5377-0. Springer Netherlands
- Saxena, I. M. y Brown, M. R. 2005. Cellulose Biosynthesis: Current Views and Evolving Concepts. *Annals of Botany.* 96: 9-21.
- SENER (Secretaría de Energía). 2007. Sistema de Información energética. <http://sie.energia.gob.mx/sie/bdiController>.
- Svensson, M. L., Christensson, K. y Björnsson, L. 2006. Biogas production from crop residues on a farm-scale level in Sweden: scale, choice of substrate and utilization rate most important parameters for financial feasibility. *Bioprocess Biosyst Eng.* 29: 137–142.
- Shin, H. S., Youn, J. H. y Kim, S. H. 2004. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int J Hydrogen Energy.* 29: 1355–1363.
- Soga, T. y Ross, G. A. 1999. Simultaneous determinations of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A.* 837: 231-239.
- Stick, R. V. 2001. Carbohydrates : the sweet molecules of life. Academic Press.
- Taguchi, F., Mizukami, N., Hasegawa, K. y Taki, S. T. 1995. Hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of *Clostridium* sp. strain No. 2. *Can. J. Microbiol.* 41: 536-540.
- Taguchi, F., Mizukami, N., Hasegawa, K. y Taki, S. T. 1994. Microbial conversion of arabinose and xylose to hydrogen by a newly isolated *Clostridium* sp. No. 2. *Can. J. Microbiol.* 40: 228-233.
- Tolan, J. J. y Finn, R. K. 1987. Fermentation of D-xylose to ethanol by genetically modified *Klebsiella planticola*. *Applied and Environmental Microbiology.* 53: 2039-2044.
- Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., Igarashi, Y. 2001. Characterization of a microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora. *J Biosci Bioeng.* 92: 397–400.
- Van Ginkel, S. W., Oh S. E. y Logan, B. E. 2005. Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. *Int J Hydrogen Energy.* 30: 1535-1542.
- Van Ginkel, S. y Sung, S. 2001. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4726-4730.
- Vignais, P. M. 2005. H/D exchange reactions and mechanistic aspects of the hydrogenases. *Coordination Chemistry Reviews.* 249: 1677-1690
- Vignais, P. M. y Colbeau, A. 2004. Molecular biology of microbial hydrogenases. *CIMB.*
- Vijayaraghavan, K. Ahmad, D. y Ibrahim, M. K. B. 2006. Biohydrogen generation from jackfruit peel using anaerobic contact filter. *Int J Hydrogen Energy.* 31: 569-579.
- Visser, A., Beeksma, I., Van der Zee, F., Stams, A. J. M. y Lettinga, G. (1993). Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulphate concentrations. *Applied. Microbiol. Biotechnol.* 40: 549-556.
- Vrije, T., Haas, G. G., Tan, G. B., Keijsers, E.R.P. y Claassen, P.A.M. 2002. Pretreatment of *Miscanthus* for hydrogen production by *Thermotoga elfii*. *International Journal of Hydrogen Energy* 27: 1381-1390.
- Wang, C. C., Chang, C. W., Chu, C. P., Lee, D. J., Chang, B. V. y Liao, C. S. 2003. Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bif fermentans*. *J Biotechnol.* 102: 83-92.
- Yang, H. y Shen, J. 2006. Effect of ferrous iron concentration on anaerobic biohydrogen production from soluble starch. *Int J Hydrogen Energy.* 31: 2137-2146.

- Yokoi, H., Aratake, T., Hirose, J., Hayashi, S. y Takasaki, Y. 2001. Simultaneous production of hydrogen and biofloculant by *Enterobacter sp.* BY-29. *J Microbiology and Biotechnology*. 17: 609-613.
- Yokoi, H., Tokushige, T., Hirose, J., Hayashi, S. y Takasaki, Y. 1998. H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogens*. *Biotech. Lett* 20: 143-147.
- Xu, Y., Du, W., Liu, D. y Zeng. 2003. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. *Biotechnology Letters* 25: 1239-1241.
- Zeikus, J. G. 1980. Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 34: 423-464.
- Zhang, M. L., Fan, T. Y., Xing, Y., Pan, Ch. M., Zhang, G. H. y Lay, J. J. 2007. Enhanced biohydrogen production from cornstalkwastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. *Biomass and Bioenergy*. 31: 250-254.
- Zhang, Y. y Shen, J. 2006. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. *Int J Hydrogen Energy*. 31: 441-446.
- Zhang, Y., Liu, G. y Shen, J. 2005. Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations. *Int J Hydrogen Energy*. 30: 855-860.
- Zhang, T., Liu, H. y Fang, H. H. P. 2003. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic conditions. *J Environ Manag.* 69: 149-56.
- Zheng, X. J. y Yu, H. Q. 2005. Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. *J Environ Manage.* 74(1): 65-70.
- Zhu , Y. y Yang, S. T. 2004. Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. *Journal of Biotechnology* 110: 143-157.