

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“COPRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO Y BIOETANOL POR
Escherichia coli WDHL UTILIZANDO COMO SUSTRATO
HIDROLIZADO DE PAJA DE TRIGO”**

Tesis que presenta

Angel Mario López Hidalgo

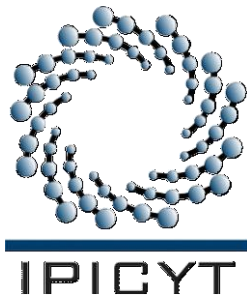
Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Antonio De León Rodríguez

San Luis Potosí, S. L. P., julio de 2013



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Coproducción de biohidrógeno y bioetanol por *Escherichia coli* WDHL utilizando como sustrato hidrolizado de paja de trigo**” presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Angel Mario López Hidalgo** y aprobada el **12 de 06 de 2013** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Antonio De León Rodríguez
(Director de la tesis)

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
(Miembro del Comité Tutorial)

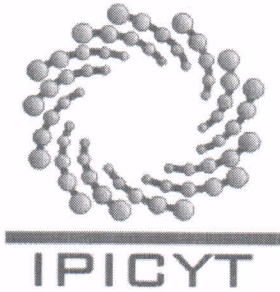
Dra. Martha Leticia Santos Martínez
(Miembro del Comité Tutorial)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Molecular perteneciente a la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C., bajo la dirección del doctor Antonio De León Rodríguez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-385574) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C., así como, apoyo financiero para la elaboración de los experimentos de parte del Fondo de Investigación de Ciencia Básica CONACYT-Básicas 178988, Secretaria de Energía en el proyecto SENER 15001 y de la REDFE.



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 110 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 5 días del mes de julio del año 2013, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Presidenta	IPICYT
Dr. Antonio De León Rodríguez	Secretario	IPICYT
Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Angel Mario López Hidalgo

sobre la Tesis intitulada:

Coproducción de biohidrógeno y bioetanol por Escherichia coli WDHL utilizando como sustrato hidrolizado de paja de trigo

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Antonio De León Rodríguez

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

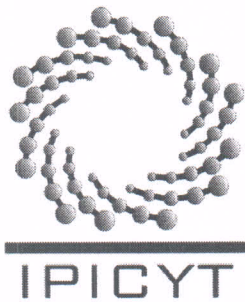
Dándose por terminado el acto a las 13:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

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 5 días del mes de julio de 2013.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado





Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Coproducción de biohidrógeno y bioetanol por Escherichia coli WDHL utilizando como sustrato hidrolizado de paja de trigo**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Angel Mario López Hidalgo** y aprobada el **cinco de julio del dos mil trece** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Antonio De León Rodríguez
Director de la tesis)

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
Miembro del Comité Tutorial

Agradecimientos

Muchas gracias al Dr. Antonio De León Rodríguez, por su dirección y asesoría. A las Dras. Irene Beatriz Castaño Navarro y Martha Leticia Santos Martínez, por ofrecer observaciones atinadas que fortalecieron el contenido de esta tesis, gracias. A mis padres y hermanos por apoyarme desmedidamente en esta etapa de mi vida, mil gracias. Agradezco a los amig@s que, con su compañía, amistad, palabras de aliento, etc., hicieron más placentera esta etapa. A los compañeros del laboratorio, por sus sugerencias y observaciones, gracias. Finalmente, gracias a Dios por darme la oportunidad de hacer realidad uno más de mis mayores proyectos.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Agradecimientos	v
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	x
Resumen	xi
Abstract	xii
1 Introducción	1
2 Materiales y métodos	3
2.1 Producción de biohidrógeno usando azúcares puros	3
2.2 Coproducción de biohidrógeno y bioetanol	3
2.3 Cultivos por lote en biorreactor	4
2.4 Uso de mezclas de hidrolizado de paja de trigo y suero de leche para optimizar la productividad de biohidrógeno	4
2.5 Métodos analíticos	5
3 Resultados y discusión	8
3.1 Caracterización del hidrolizado de paja de trigo	8
3.2 Producción de biohidrógeno a partir de carbohidratos puros	8
3.3 Coproducción de biohidrógeno y bioetanol utilizando como sustrato hidrolizado de paja de trigo	11
3.3.1 Producción y productividad de biohidrógeno	11
3.3.2 Producción y productividad de bioetanol	17
3.3.3 Coproducción de biohidrógeno y bioetanol bajo condiciones óptimas	22
3.4 Determinación del efecto de la concentración de suero de leche e hidrolizado de paja de trigo en la producción y productividad de biohidrógeno	28
Conclusiones	34
Referencias	35

Lista de tablas

Tabla 1 Diseño experimental central compuesto para optimizar la producción y productividad de biohidrógeno y bioetanol, utilizando como sustrato hidrolizado de paja de trigo.	6
Tabla 2 Diseño experimental central compuesto para optimizar la productividad de biohidrógeno utilizando como fuente de carbono mezclas de hidrolizado de paja de trigo y suero de leche.	7
Tabla 3 Composición del hidrolizado de paja de trigo.	9
Tabla 4 Resultados de producción y productividad de biohidrógeno con el diseño experimental Central Compuesto.	13
Tabla 5 Análisis de varianza para ajustar el modelo de la producción de biohidrógeno, usando como fuente de carbono hidrolizado de paja de trigo.	14
Tabla 6 Análisis de varianza para ajustar el modelo de la productividad de biohidrógeno, usando como sustrato hidrolizado de paja de trigo.	15
Tabla 7 Resultados de producción y productividad de bioetanol con el diseño experimental Central Compuesto.	18
Tabla 8 Análisis de varianza para ajustar el modelo de la producción de bioetanol, usando como fuente de carbono hidrolizado de paja de trigo.	19
Tabla 9 Análisis de varianza para ajustar el modelo de la productividad de bioetanol, usando como sustrato hidrolizado de paja de trigo.	20
Tabla 10 Comparación de rendimiento de biohidrógeno y VPH con diferentes sustratos y microorganismos	24
Tabla 11 Comparación de rendimientos, velocidad de producción y concentración de biohidrógeno y bioetanol	27

Tabla 12 Resultados de producción y productividad de biohidrógeno, del diseño experimental Central Compuesto, usando como fuente de carbono mezclas de hidrolizado de paja de trigo y suero de leche. 30

Tabla 13 Análisis de varianza para la producción de biohidrógeno, usando como fuente de carbono mezclas de hidrolizado de paja de trigo y suero de leche. 31

Tabla 14 Análisis de varianza para ajustar el modelo de la productividad de biohidrógeno, usando como fuente de carbono mezclas de hidrolizado de paja de trigo y suero de leche. 32

Lista de figuras

- Fig. 1 Cultivo por lote de *E. coli* WDHL usando 20 g/L de carbohidrato (xilosa, galactosa, arabinosa, fructosa, glucosa, maltosa), a pH inicial de 6.5 e incubado a 37°C. 10
- Fig. 2 Superficies de respuesta para la producción de biohidrógeno (A, B y C) y productividad (D, E y F) por la cepa WDHL. pH ajustado a 6.5 en A y D; temperatura fijada a 37°C en B y E; concentración de hidrolizado de paja de trigo fijada a 15 g/L en C y F. 16
- Fig. 3 Superficies de respuesta para la producción de bioetanol (A, B y C) y productividad (D, E y F) por la cepa WDHL. pH ajustado a 6.5 en A y D; temperatura fijada a 37°C en B y E; concentración de hidrolizado de paja de trigo fijada a 15 g/L en C y F. 21
- Fig. 4 (A) Producción y productividad de biohidrógeno bajo condiciones óptimas (pH 8.2, 31 °C y 23.4 g/L HPT). (B) Producción de metabolitos bajo condiciones óptimas, usando como fuente de carbono hidrolizado de paja de trigo. 23
- Fig. 5 (A) Cultivo en biorreactor por lote de *E. coli* WDHL en condiciones óptimas: 23.4 g/L de HPT, pH inicial de 8.2 y 31° C. (B) Producción de bioetanol durante el cultivo en biorreactor en condiciones óptimas. (C) Cambio de pH y potencial redox durante el cultivo en biorreactor en condiciones óptimas. 26
- Fig. 6 Superficie de respuesta para productividad de biohidrógeno. 33

Resumen

Coproducción de biohidrógeno y bioetanol por *Escherichia coli* WDHL utilizando como sustrato hidrolizado de paja de trigo

Este estudio muestra la capacidad de la cepa *Escherichia coli* WDHL para metabolizar pentosas que comúnmente se encuentran en los hidrolizados lignocelulósicos. El hidrolizado de paja de trigo (HPT) contiene 1.83 g de carbohidratos (C-HPT). Se utilizó un diseño experimental Central Compuesto para determinar el efecto del pH, la temperatura y la concentración de HPT en la producción de biohidrógeno y bioetanol, así como, en la productividad de ambos biocombustibles. La metodología de superficies de respuesta fue usada para optimizar las variables de respuestas. Las condiciones óptimas empleadas para coproducir biohidrógeno y bioetanol son pH 8.2, 31°C y 23.4 g/L de HPT, éstas se probaron en un cultivo por lote en biorreactor de 1 L, obteniendo producciones de biohidrógeno y bioetanol de 3,177 mL H₂ y 8.86 g/L, respectivamente. Se logró un alto rendimiento en la producción simultánea de biohidrógeno, 228.14 mL H₂/g C-HPT (1.41 mol H₂/mol C-HPT), y bioetanol, 0.64 g EtOH/g C-HPT (2.09 mol EtOH/mol C-HPT). Los resultados obtenidos mostraron que el proceso se afecta por el cambio en las condiciones de cultivo (pH y temperatura). El efecto de las concentraciones de hidrolizado de paja de trigo y suero de leche (SL) en la productividad de biohidrógeno fue determinado, y los resultados obtenidos mostraron que el suero de leche puede mejorarla. Las condiciones óptimas para maximizar la productividad de biohidrógeno son 16.7 g/L HPT y 8.7 g/L SL. Este trabajo enriquece la información acerca de la coproducción de biocombustibles de segunda generación.

Palabras clave: Biohidrógeno, Bioetanol, *Escherichia coli* WDHL, Hidrolizado de paja de trigo.

Abstract

Coproduction of biohydrogen and bioethanol by *Escherichia coli* WDHL using wheat straw hydrolysate as substrate

This study reports the ability of *Escherichia coli* WDHL strain to metabolize pentoses commonly found in lignocellulosic hydrolysates. The wheat straw hydrolyzate (WSH) contains 1.83 g of carbohydrate (C-WSH). A Central Composite experimental design was used to determine the effect of pH, temperature and concentration of WSH in biohydrogen and bioethanol production, as well as productivity of both biofuels. Surface response methodology was used to optimize variable responses. The optimal conditions to coproduce biohydrogen and bioethanol were pH 8.2, 31°C and 23.4 g/L of WSH, with these conditions a batch culture was performed in a 1 L bioreactor, and biohydrogen production was 3,177 mL H₂ and bioethanol production was 8.86 g/L. High yield of simultaneous biohydrogen production, 228.14 ml H₂/g C-WSH (1.44 mol H₂/mol C-WSH), and bioethanol production, 0.64 g EtOH/g C-WSH (2.09 mol EtOH/mol C-WSH), was achieved. Results obtained showed that the process was affected by the change in culture conditions (pH and temperature). The effect of mixing wheat straw hydrolysate and cheese whey (CW) concentration on biohydrogen productivity was determined, and results obtained showed that cheese whey can improve it. The optimal conditions to maximize biohydrogen productivity were 16.7 g/L WSH y 8.7 g/L CW. This work enriches the information about the coproduction of second generation biofuels.

Keywords: Biohydrigen, Bioethanol, *Escherichia coli* WDHL, Wheat straw hydrolyzate.

1 Introducción

Debido a la crisis energética y la creciente preocupación por el cambio climático, el desarrollo de fuentes de energía alternativa es de gran interés. Hoy en día el suministro de energía depende en gran medida de los combustibles fósiles, a pesar de los grandes esfuerzos que se están realizando en todo el mundo para utilizar combustibles no carbonosos producidos a partir de materias primas renovables, ya que éstos tienen un menor número de emisiones de gases de efecto invernadero durante su producción y uso (Cheng et al., 2011). La energía de biomasa es una prominente fuente de energía renovable, pero la materia prima usada para la producción debe provenir de cultivos no alimentarios o desechos agrícolas (materia prima de segunda generación), para evitar la competencia con las fuentes de alimento y tierras cultivables. Los biocombustibles de segunda generación mayormente utilizan materiales lignocelulósicos para la producción de combustibles líquidos o gaseosos, ya que pueden ser degradados a carbohidratos monoméricos como glucosa, arabinosa y xilosa. La paja de trigo es uno de los más abundantes componentes de desechos agrícolas y tiene potencial para la producción de biocombustibles, incluyendo el hidrógeno (Cheng et al., 2011; Kongjan et al., 2010; Lo et al., 2011). El biohidrógeno es definido como hidrógeno producido biológicamente (mayormente por bacterias) a partir de materiales orgánicos de desecho, su producción requiere el uso mínimo o nulo de hidrocarburos; para algunas aplicaciones es una alternativa a los combustibles fósiles (Demirbas, 2009). Los métodos de producción de biohidrógeno generalmente comprenden: producción fotosintética y fermentación oscura (Fangkum and Reungsang, 2011). La fermentación oscura es un fenómeno que ocurre bajo condiciones anóxicas y como sustratos es posible usar una variedad amplia de fuentes de carbono; además de producir metabolitos valiosos, tales como ácidos butírico, láctico y acético (Das and Veziroglu, 2008). Los microorganismos usados en la fermentación generan hidrógeno molecular durante la descomposición de sustratos de carbohidratos. La producción de biohidrógeno

mediante fermentación oscura a partir de hidrolizados celulósicos ha sido probada con éxito (de Vrije et al., 2009; Rai et al., 2012). Recientemente, la coproducción de bioetanol con otros biocombustibles, como el biogás, a partir de cultivos energéticos (por ejemplo: centeno, canola y habas) fue reportada (Petersson et al., 2007). Sin embargo, todavía existe la necesidad de estudios sobre multibiocombustibles (bioetanol, biohidrógeno y biogás) que podrían ayudar a la evaluación de nuevos conceptos, tales como, biorrefinería; es decir, producción de biocombustibles a partir de residuos agrícolas (Kaparaju et al., 2009). Los objetivos de esta investigación son: A) explorar la posibilidad de usar hidrolizado de paja de trigo para la coproducción de biohidrógeno y bioetanol; y B) aumentar la productividad (velocidad de producción) de biohidrógeno, usando mezclas de hidrolizado de paja de trigo y suero de leche. Se escogió el suero de leche por ser un desecho rico en vitaminas, minerales, proteínas y lactosa, que lo hacen un sustrato fácil de fermentar (Guimaraes et al., 2010). El suero de leche es un subproducto de la producción de queso y representa un 85–90% del volumen total de la leche procesada. Sólo una pequeña proporción es usada en la industria alimentaria, como alimento animal, el resto puede ser un contaminante si no se confina de una manera apropiada. Es una materia prima barata que ha sido probada en la producción de biohidrógeno como fuente de carbono (Davila-Vazquez et al., 2009; Rai et al., 2012; Rosales-Colunga et al., 2010). La optimización de las condiciones de fermentación, los parámetros nutricionales y ambientales son de primera importancia para el desarrollo de bioprocesos. Para minimizar el error en la determinación del efecto de estos parámetros es posible usar diseños experimentales, además, son métodos de ahorro de tiempo (Pan et al., 2008). Por esta razón, optimizamos las condiciones de operación para la producción y productividad de biohidrógeno y bioetanol: temperatura, pH y concentración de la fuente de carbono.

2 Materiales y métodos

2.1 Producción de biohidrógeno usando azúcares puros

Se determinó la capacidad de la cepa de *E.coli* WDHL para producir biohidrógeno a partir de monosacáridos comúnmente encontradas en material lignocelulósico (Kongjan et al., 2010) como la glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa y fructosa. También se evaluó maltosa como sustrato. Todos a una concentración de 20 g/L. Los experimentos se realizaron en botellas serológicas conteniendo 110 mL de medio HP (0.8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.43 g/L Na₂HPO₄, 0.2 g/L KH₂PO₄), 1 mL/L de solución de elementos traza (Rosales-Colunga et al., 2010), 0.01 g/L MgSO₄ y 2.75 g/L de extracto de levadura. El cultivo se ajustó a una OD_{600nm} de 1.0 y pH 7.5 al inicio de la fermentación, se incubó a 37°C durante 50 horas, con agitación de 175 rpm. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

2.2 Coproducción de biohidrógeno y bioetanol

Se usó un diseño experimental Central Compuesto para encontrar las condiciones óptimas de la producción de biohidrógeno usando hidrolizado de paja de trigo (HPT) como fuente de carbono (Tabla 1). El pH, la temperatura (T) y concentración de HPT se utilizaron como variables independientes. Se incluyeron seis puntos centrales (Oehlert, 2010). Las variables de respuesta analizadas fueron: productividad de biohidrógeno, producción y productividad de etanol. Los experimentos se realizaron en botellas serológicas de 120 mL con medio B (Davila-Vazquez et al., 2011), 1 mL/L de solución de elementos traza, 0.01 g/L MgSO₄ y 2.75 g/L de extracto de levadura. Los cultivos se ajustaron a 1.5 OD_{600nm} y agitados a 175 rpm. La producción de biohidrógeno se determinó mediante desplazamiento de NaOH 1 N y cromatografía de gases (Agilent Technologies 6890N Network GC Systems) (Davila-Vazquez et al., 2008). Los datos se analizaron según la metodología de superficie de respuesta (MSR). Análisis de la varianza (ANOVA), MSR y las condiciones óptimas se realizaron utilizando el software Statgraphics Plus 5.0 V (Statistical Graphics Co). La prueba F de ANOVA

se utilizó para evaluar los modelos ajustados. La significancia de cada coeficiente se determinó con la prueba de t con un valor P menor que 0.05.

2.3 Cultivos por lote en biorreactor

Un cultivo por lote se realizó usando medio B con 23.4 g/L de HPT en un biorreactor de 1 L (Applikon, Foster City, CA) equipado con dos turbinas Rushton de seis aspas planas. El potencial redox, pH, oxígeno disuelto y CO_2 fue monitoreado usando electrodos (Applikon) y conectados a una Bioconsola ADI 1035 (Applikon) y un Biocontrolador ADI 1030 (Applikon). El software BioXpert 1.3 (Applikon) fue usado para la adquisición de datos. El cultivo se mantuvo a 31°C , con una agitación de 200 rpm y un pH inicial de 8.2.

2.4 Uso de mezclas de hidrolizado de paja de trigo y suero de leche para optimizar la productividad de biohidrógeno

La productividad de biohidrógeno se optimizó usando un diseño experimental Central Compuesto (Tabla 2). Como sustrato se utilizaron mezclas de HPT y suero de leche (SL) en diferentes proporciones, las concentraciones de estos se consideraron como variables independientes. Se incluyeron cinco puntos centrales, los experimentos se realizaron en botellas serológicas de 120 mL con medio B, 1 mL/L de solución de elementos traza, 0.01 g/L MgSO_4 y 2.75 g/L de extracto de levadura. Los cultivos se ajustaron a una $\text{OD}_{600\text{nm}}$ de 1.5 y pH inicial 8.2, incubados a 31°C y agitados a 175 rpm. La producción de biohidrógeno se determinó mediante desplazamiento de NaOH 1 N y cromatografía de gases (Agilent Technologies 6890N Network GC Systems). Para el análisis de datos se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR). El ANOVA, MSR y las condiciones óptimas se obtuvieron utilizando el software Statgraphics Plus 5.0 V (Statistical Graphics Co). La prueba F de ANOVA se utilizó para evaluar los modelos ajustados. La significancia de cada coeficiente se determinó con la prueba de t con un valor P menor que 0.05.

2.5 Métodos analíticos

Los azúcares reductores totales (ART) se midieron usando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller et al., 2009). La concentración de carbohidratos y metabolitos se cuantificó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo Agilent equipado con un detector de índice de refracción (Agilent Technologies 1220 Infinity LC). Se usó una columna para análisis de ácidos orgánicos Phenomenex Rezex ROA operada a 60°C con H₂SO₄ 0.0025 M como fase móvil a 0.55 mL/min. La suma de pentosas (xilosa y arabinosa) y glucosa se reportan como carbohidratos contenidos en el hidrolizado de la paja de trigo (C-HPT). El furfural se determinó espectrofotométricamente mediante el método establecido por la norma mexicana NMX-V-004-1970 (SCFI, 1970), con algunas modificaciones (Anexo).

Tabla 1 Diseño experimental central compuesto para optimizar la producción y productividad de biohidrógeno y bioetanol, utilizando como sustrato hidrolizado de paja de trigo.

Experimento	HPT (g/L)	T (°C)	pH
1	10	28	5.5
2	15	37	6.5
3	15	37	6.5
4	10	46	7.5
5	15	37	6.5
6	20	28	7.5
7	10	28	7.5
8	15	37	8.2
9	20	46	5.5
10	15	37	6.5
11	10	46	5.5
12	15	52.1	6.5
13	15	21.9	6.5
14	15	37	6.5
15	20	46	7.5
16	6.6	37	6.5
17	20	28	5.5
18	23.4	37	6.5
19	15	37	6.5
20	15	37	4.8

Tabla 2 Diseño experimental central compuesto para optimizar la productividad de biohidrógeno utilizando como fuente de carbono mezclas de hidrolizado de paja de trigo y suero de leche.

Experimento	HPT (g/L)	SL (g/L)
1	15	8.7
2	10	10
3	21.3	15
4	15	15
5	15	21.3
6	15	15
7	8.7	15
8	15	15
9	15	15
10	20	20
11	10	20
12	15	15
13	20	10

3 Resultados y discusión

3.1 Caracterización del hidrolizado de paja de trigo

En la tabla 3 se muestran los componentes del HPT, el lote analizado contuvo 21 g/L de ART. La xilosa es el carbohidrato mayoritario (13.96 g/L), otros azúcares detectados en concentraciones menores son la glucosa (1.53 g/L) y arabinosa (1.93 g/L), los cuales son comunes en hidrolizados hemicelulósicos (Rubin, 2008). También se encontró ácido fórmico y ácido acético, en concentraciones de 1.01 y 3.59 g/L, respectivamente. Estos compuestos son derivados del pretratamiento del material hemicelulósico y la sacarificación (Mills et al., 2009). La concentración de furfural en el HPT es de 0.12 g/L, de acuerdo con Mills et al. (2009) éste componente es resultado de la deshidratación de azúcares durante el pretratamiento y se encuentra típicamente en un rango de 0 a 5 g/L.

3.2 Producción de biohidrógeno a partir de carbohidratos puros

En la figura 1 se muestra la producción de biohidrógeno usando los carbohidratos puros como sustratos. *E. coli* WDHL metaboliza a todos ellos, obteniéndose la mayor producción con xilosa (79 ± 5.4 mL H₂, n=3), la cual es la mayor pentosa en el hidrolizado de paja de trigo. Por otro lado, la menor producción se obtuvo al usar maltosa (18 ± 0.3 mL H₂, n=3). Estos resultados demuestran que HPT puede ser usado satisfactoriamente como sustrato.

Tabla 3 Composición del hidrolizado de paja de trigo.

Componente	Concentración (g/L)
Azúcares reductores	21
Glucosa	1.54
Xilosa	3.96
Arabinosa	1.93
Ácido fórmico	1.01
Ácido acético	3.59
Furfural	0.12

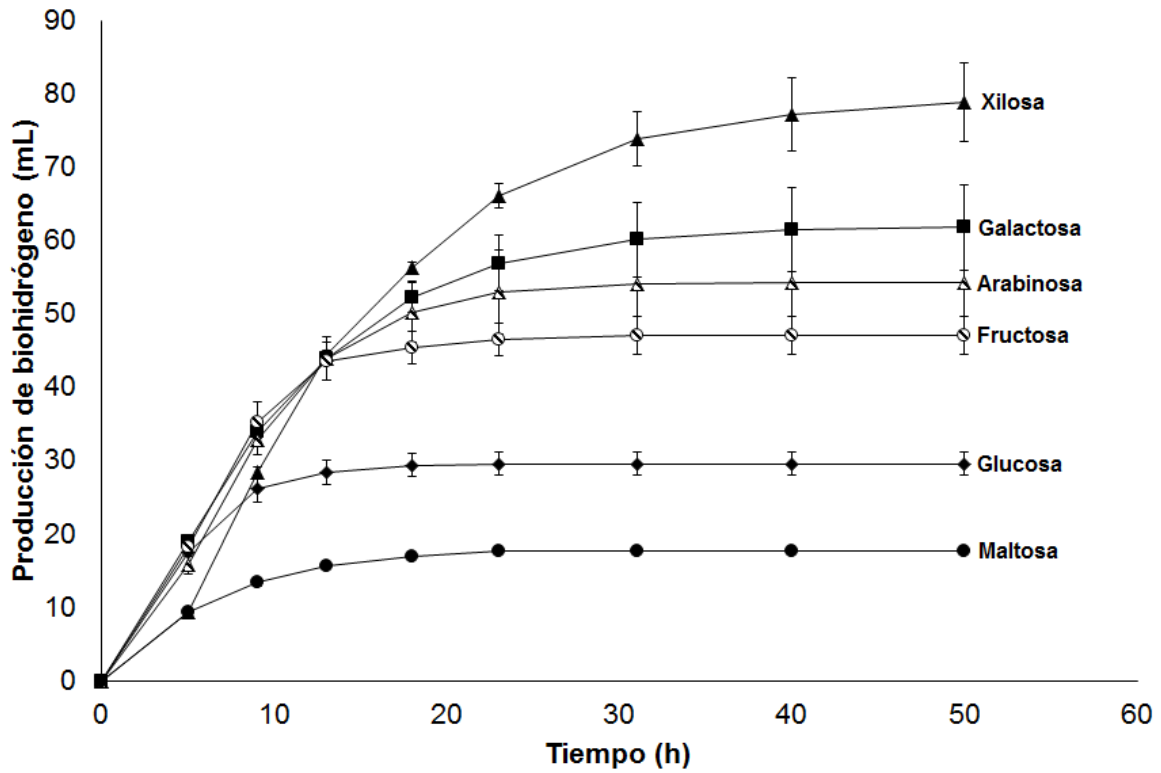


Fig. 1 Cultivo por lote de *E. coli* WDHL usando 20 g/L de carbohidrato (xilosa, galactosa, arabinosa, fructosa, glucosa, maltosa), a pH inicial de 6.5 e incubado a 37°C.

3.3 Coproducción de biohidrógeno y bioetanol utilizando como sustrato hidrolizado de paja de trigo

3.3.1 Producción y productividad de biohidrógeno

El efecto de la concentración del sustrato, pH y temperatura en la producción de biohidrógeno fue evaluada con un diseño experimental Central Compuesto, los resultados aparecen en la Tabla 4. Los puntos centrales (experimentos 2, 3, 5, 10, 14 y 19) produjeron en promedio 314.6 ± 37.6 mL H₂. El experimento 18 tuvo la mayor producción (460 mL H₂), en el cual la concentración de HPT fue de 23.4 g/L, la temperatura de incubación 37°C y el pH inicial 6.5. Se observó que en los experimentos en los que el pH fue 5.5 (1, 9, 11 y 17) produjeron menos de 10 mL H₂. La producción en cultivos a altas temperaturas (46 y 52.1°C) fue menor a 5 mL H₂.

El modelo matemático que representa la producción de biohidrógeno como una función de las variables evaluadas en la región experimental se expresa en la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Biohidrógeno (mL H}_2\text{)} = & -5407.05 + 34.2334 \cdot \text{HPT} + 217.315 \cdot \text{T} + 432.6 \cdot \text{pH} - \\ & 0.966519 \cdot \text{HPT}^2 - 0.343056 \cdot \text{HPT} \cdot \text{T} + 2.8025 \cdot \text{HPT} \cdot \text{pH} - 2.24686 \cdot \text{T}^2 - \\ & 8.61806 \cdot \text{T} \cdot \text{pH} - 8.50083 \cdot \text{pH}^2 \end{aligned}$$

Con el análisis de varianza (Tabla 5) se determinó que la producción de biohidrógeno es afectada por T, T² y T•pH. Esto coincide con otros estudios en los que tanto la temperatura como el pH afectan el proceso (Chong et al., 2009; Rosales-Colunga et al., 2010; Saraphirom and Reungsang, 2010). Las condiciones óptimas iniciales obtenidas a partir de esta regresión fueron pH de 8.2, 31°C y 23.4 g/L de HPT (Fig. 2A y 2B).

El efecto de la temperatura, pH y concentración de HPT sobre la productividad también fue evaluado, los resultados del diseño experimental se observan en la

Tabla 4. En promedio los puntos centrales tuvieron una productividad de 6.827 ± 1.393 mL H₂/L h, la máxima productividad (21.003 mL H₂/L h) fue obtenida por el experimento 8. Experimentos que presentan una productividad menor a 1 mL H₂/L h, fueron incubados a 28 °C con un pH de 5.5, o bien a baja (21.9°C) o altas (46 y 52.1°C) temperaturas. El modelo matemático que representa la productividad es:

$$\begin{aligned} \text{Productividad (mL H}_2\text{/L h)} = & -85.5416 + 1.26399 \cdot \text{HPT} + 5.24501 \cdot T - 6.86014 \cdot \text{pH} - \\ & 0.0265349 \cdot \text{HPT}^2 + 0.0118278 \cdot \text{HPT} \cdot T - 0.11105 \cdot \text{HPT} \cdot \text{pH} - \\ & 0.0340649 \cdot T^2 - 0.461667 \cdot T \cdot \text{pH} + 2.17301 \cdot \text{pH}^2 \end{aligned}$$

La tabla 6 muestra que la productividad fue afectada por pH, T², T•pH y pH². Chong et al. (2009), también encuentra que el pH, pH•T, T² y pH² afectan la productividad. Los gráficos de superficies de respuesta de las Fig. 2C y 2D fueron obtenidos utilizando la ecuación anterior. Las condiciones óptimas para maximizar la productividad son 12 g/L HPT, 24°C y pH 8.2.

Tabla 4 Resultados de producción y productividad de biohidrógeno con el diseño experimental Central Compuesto.

Experimento	Producción (mL H₂)	Productividad (mL H₂/L h)
1	2.0	0.073
2	401.2	8.429
3	304.0	5.727
4	0.5	0.758
5	274.7	4.075
6	371.5	10.780
7	252.2	12.857
8	326.5	21.003
9	4.5	6.818
10	309.2	7.248
11	3.0	4.545
12	0.0	0.000
13	16.5	0.709
14	310.8	7.469
15	0.5	0.758
16	98.2	2.638
17	7.7	0.173
18	459.9	9.927
19	289.4	7.916
20	320.2	7.607

Tabla 5 Análisis de varianza para ajustar el modelo de la producción de biohidrógeno, usando como fuente de carbono hidrolizado de paja de trigo.

Fuente	SS^a	GL^b	MS^c	Razón F	Valor P
HPT	39536.2	1	39536.2	5.06	0.0510
T	74111.2	1	74111.2	9.49	0.0131
pH	27974.4	1	27974.4	3.58	0.0910
HPT ²	8005.26	1	8005.26	1.02	0.3378
HPT•T	1906.53	1	1906.53	0.24	0.6331
HPT•pH	1570.8	1	1570.8	0.20	0.6644
T ²	278512	1	278512	35.66	0.0002
T•pH	48127.5	1	48127.5	6.16	0.0349
pH ²	990.814	1	990.814	0.13	0.7299
Total error	70297.4	9	7810.82		
Total (corr.)	495936	18			

^a Suma de cuadrados

^b Grados de libertad

^c Cuadrado medio

Tabla 6 Análisis de varianza para ajustar el modelo de la productividad de biohidrógeno, usando como sustrato hidrolizado de paja de trigo.

Fuente	SS^a	GL^b	MS^c	Razón F	Valor P
HPT	11.5267	1	11.5267	1.72	0.2190
T	10.8886	1	10.8886	1.62	0.2312
pH	95.2947	1	95.2947	14.22	0.0037
HPT ²	6.34192	1	6.34192	0.95	0.3536
HPT•T	2.26632	1	2.26632	0.34	0.5738
HPT•pH	2.46642	1	2.46642	0.37	0.5576
T ²	109.72	1	109.72	16.37	0.0023
T•pH	138.112	1	138.112	20.61	0.0011
pH ²	68.0493	1	68.0493	10.15	0.0097
Total error	67.0146	10	6.70146		
Total (corr.)	529.907	19			

^a Suma de cuadrados

^b Grados de libertad

^c Cuadrado medio

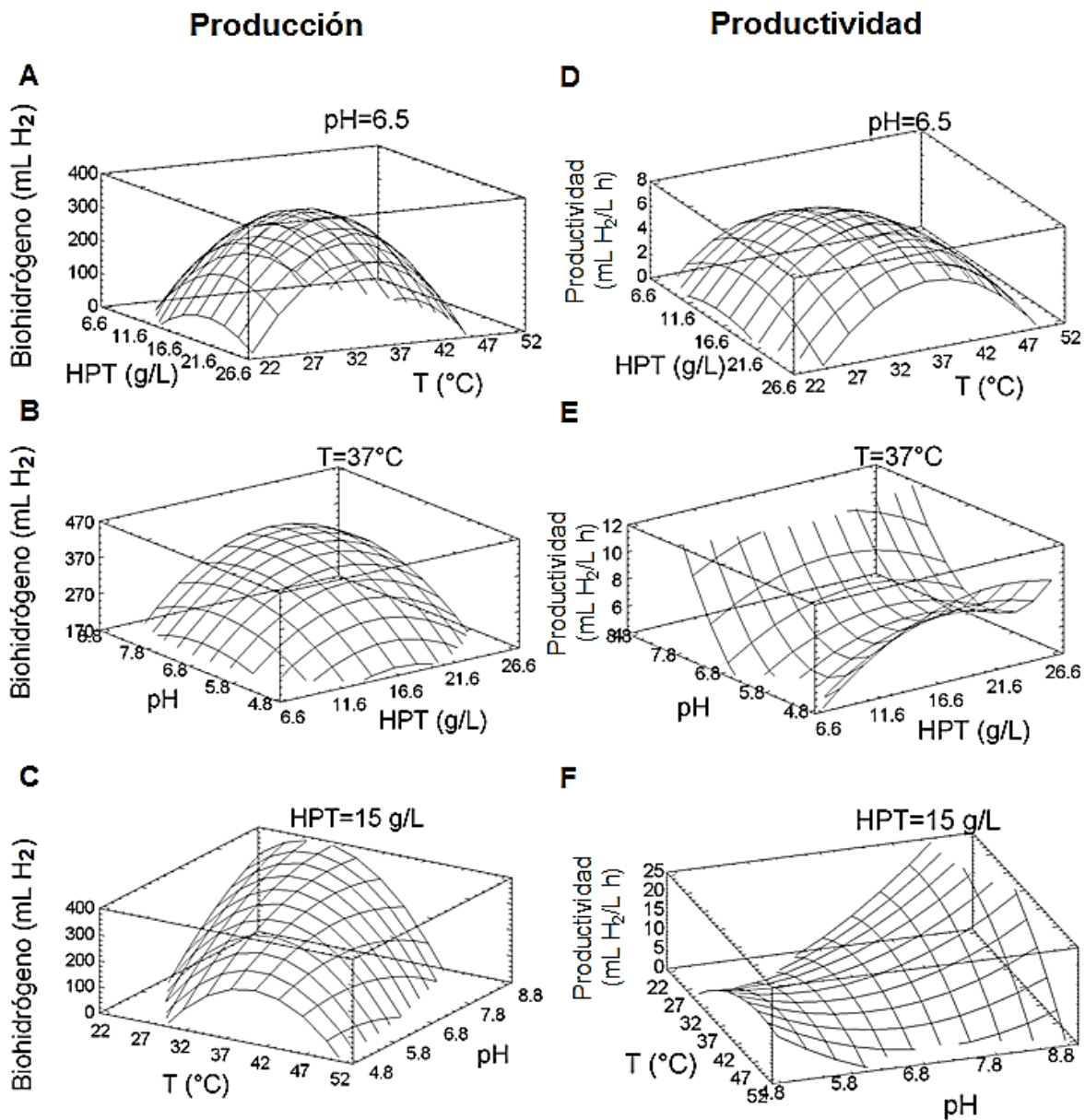


Fig. 2 Superficies de respuesta para la producción de biohidrógeno (A, B y C) y productividad (D, E y F) por la cepa WDHL. pH ajustado a 6.5 en A y D; temperatura fijada a 37°C en B y E; concentración de hidrolizado de paja de trigo fijada a 15 g/L en C y F.

3.3.2 Producción y productividad de bioetanol

Los resultados del diseño experimental Central Compuesto para la producción y productividad de bioetanol se muestran en la Tabla 7. La mayor producción de bioetanol, 8.208 g/L, se obtuvo en el experimento 6 (20 g/L HPT, 28°C y pH 7.5); mientras que, la mayor productividad (0.0538 g/L² h) se presenta cuando las condiciones de trabajo son: 15 g/L HPT, 37°C y pH 8.2 (experimento 8).

La producción de bioetanol es representada, como una función de las variables evaluadas en la región experimental, por el siguiente modelo matemático:

$$\text{Bioetanol (g/L)} = -121.256 + 1.07331 \cdot \text{HPT} + 3.84661 \cdot T + 14.3194 \cdot \text{pH} - 0.0363524 \cdot \text{HPT}^2 - 0.00862114 \cdot \text{HPT} \cdot T + 0.0775902 \cdot \text{HPT} \cdot \text{pH} - 0.0354556 \cdot T^2 - 0.184907 \cdot T \cdot \text{pH} - 0.590215 \cdot \text{pH}^2$$

Del modelo anterior las variables que afectan la producción de bioetanol son T² y T•pH (Tabla 8), para dicho proceso las condiciones óptimas fueron pH inicial de 8.2, 30.5°C y 20 g/L de HPT, en las Fig. 3A y 3B se observan las superficies de respuesta. Esta metodología (MSR) ya ha sido usada para optimizar la producción de etanol (Grahovac et al., 2012). Por otro lado, al evaluar el efecto de la temperatura, pH y concentración de HPT sobre la productividad (Tabla 7) se obtuvo que las variables que la afectan son pH y T² (Tabla 9), las superficies de respuesta obtenidas por el modelo matemático que aparece a continuación se muestran en las Fig. 3C y 3D. Las condiciones óptimas para aumentar la productividad fueron 19.5 g/L de HPT, 29°C y pH 8.2.

$$\text{Productividad de bioetanol (g/L}^2 \text{ h)} = -0.15788 + 0.00229894 \cdot \text{HPT} + 0.011831 \cdot T - 0.0254812 \cdot \text{pH} - 0.0000816347 \cdot \text{HPT}^2 - 0.0000197222 \cdot \text{HPT} \cdot T + 0.0001775 \cdot \text{HPT} \cdot \text{pH} - 0.00010049 \cdot T^2 - 0.000693056 \cdot T \cdot \text{pH} + 0.00435844 \cdot \text{pH}^2$$

Tabla 7 Resultados de producción y productividad de bioetanol con el diseño experimental Central Compuesto.

Experimento	Producción (g/L)	Productividad (g/L h)
1	0.000	0.0000
2	7.270	0.0154
3	6.669	0.0148
4	0.000	0.0000
5	6.766	0.0143
6	8.208	0.0285
7	5.105	0.0214
8	6.429	0.0538
9	0.000	0.0000
10	6.580	0.0177
11	0.000	0.0000
12	0.000	0.0000
13	0.000	0.0000
14	6.580	0.0162
15	0.000	0.0000
16	3.063	0.0138
17	0.000	0.0000
18	8.042	0.0207
19	7.116	0.0190
20	6.478	0.0169

Tabla 8 Análisis de varianza para ajustar el modelo de la producción de bioetanol, usando como fuente de carbono hidrolizado de paja de trigo.

Fuente	SS^a	GL^b	MS^c	Razón F	Valor P
HPT	9.64756	1	9.64756	2.47	0.1473
T	12.9784	1	12.9784	3.32	0.0984
pH	12.8202	1	12.8202	3.28	0.1002
HPT ²	11.9028	1	11.9028	3.04	0.1116
HPT•T	1.20405	1	1.20405	0.31	0.5911
HPT•pH	1.20405	1	1.20405	0.31	0.5911
T ²	118.861	1	118.861	30.41	0.0003
T•pH	22.1554	1	22.1554	5.67	0.0386
pH ²	5.0202	1	5.0202	1.28	0.2835
Total error	39.0902	9	3.90902		
Total (corr.)	224.529	18			

^a Suma de cuadrados

^b Grados de libertad

^c Cuadrado medio

Tabla 9 Análisis de varianza para ajustar el modelo de la productividad de bioetanol, usando como sustrato hidrolizado de paja de trigo.

Fuente	SS^a	GL^b	MS^c	Razón F	Valor P
HPT	0.0000256178	1	0.0000256178	0.40	0.5422
T	0.000182327	1	0.000182327	2.83	0.1232
pH	0.000917826	1	0.000917826	14.56	0.0036
HPT ²	0.0000600255	1	0.0000600255	0.93	0.3569
HPT•T	0.00000630125	1	0.00000630125	0.10	0.7608
HPT•pH	0.00000630125	1	0.00000630125	0.10	0.7608
T ²	0.000954816	1	0.000954816	14.84	0.0032
T•pH	0.000311251	1	0.000311251	4.84	0.0525
pH ²	0.000273755	1	0.000273755	4.25	0.0661
Total error	0.000643453	10	0.0000643453		
Total (corr.)	0.0034788	19			

^a Suma de cuadrados

^b Grados de libertad

^c Cuadrado medio

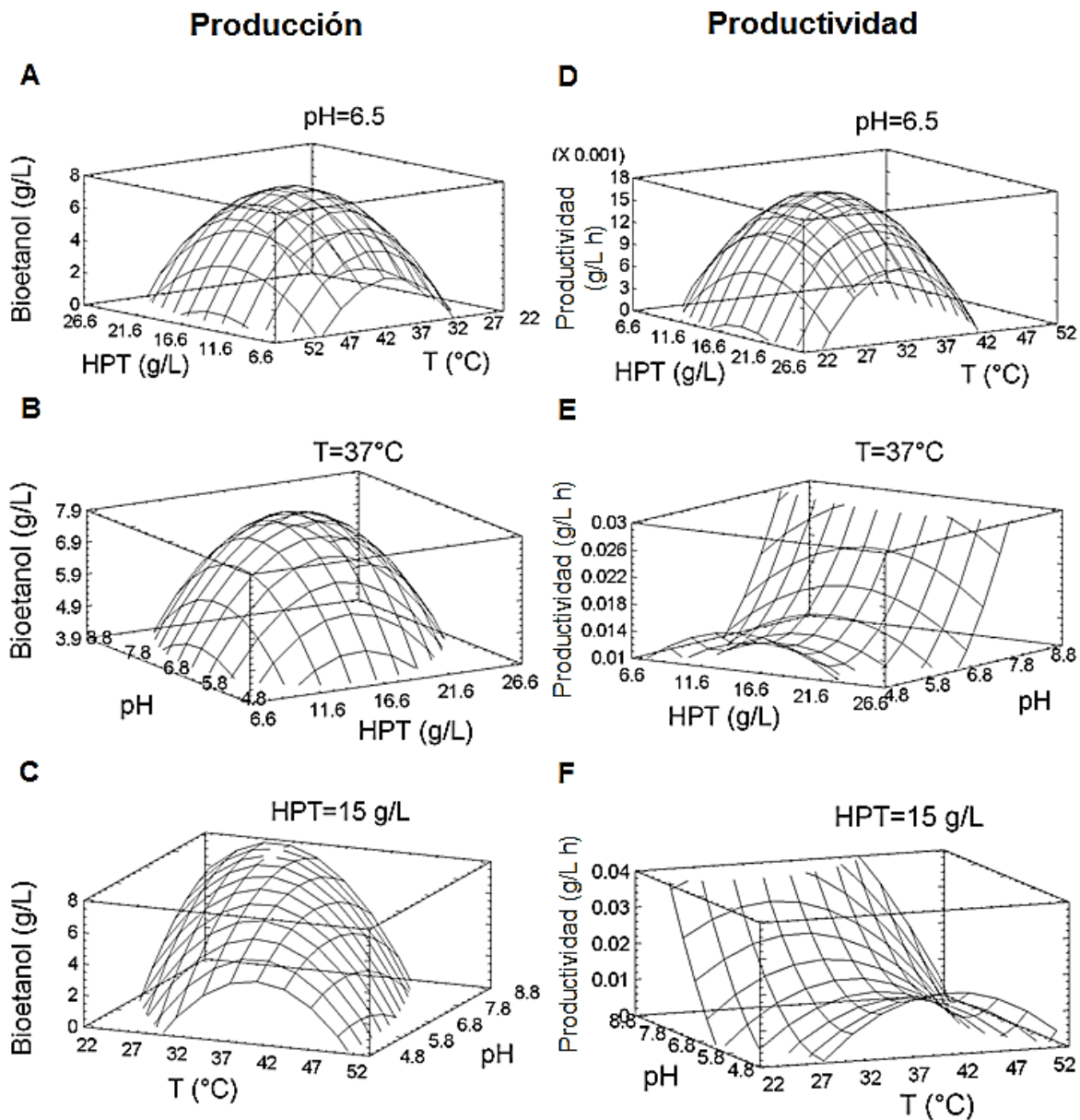


Fig. 3 Superficies de respuesta para la producción de bioetanol (A, B y C) y productividad (D, E y F) por la cepa WDHL. pH ajustado a 6.5 en A y D; temperatura fijada a 37°C en B y E; concentración de hidrolizado de paja de trigo fijada a 15 g/L en C y F.

3.3.3 Coproducción de biohidrógeno y bioetanol bajo condiciones óptimas

Las condiciones óptimas obtenidas (pH 8.2, 31°C y 23.4 g/L HPT) para maximizar la producción de biohidrógeno se probaron para su confirmación, el modelo predecía 516.6 mL H₂, y el valor experimental fue de 498 ± 14.5 (n = 3) mL H₂. En la Fig. 4A se observan la producción y productividad (valor máximo: 9.5 ± 0.8 mL H₂/L h) alcanzadas bajo éstas condiciones.

El hidrolizado de paja de trigo contiene 1.83 g (0.012 moles) de carbohidratos (C-HPT). Con este valor se determinaron el rendimiento y la velocidad de producción de biohidrógeno (VPH) que se encuentran en la Tabla 10, así como su comparación con otros estudios. Fangkum & Reungsang (2011) reportan un rendimiento de 1.48 ± 0.22 mol H₂/mol azúcar, que es menor a lo alcanzado en este estudio (1.68 ± 0.51 mol H₂/mol C-HPT).

La razón entre el volumen de hidrógeno producido y los gramos de carbohidratos consumidos, reportados por Kongjan et al. (2010), Kongjan & Angelidaki (2010) y Lo et al. (2011), son de 178.0 ± 10.1, 212.0 ± 6.6, 147.09 y 124.77, respectivamente. Dichos valores están por debajo de los 271.96 ± 7.80 mL H₂/g C-HPT obtenidos por *E. coli* WDHL usando hidrolizado de paja de trigo como sustrato.

Al comparar la VPH (228 ± 19.2 mL H₂/L d), se observa (Tabla 10) que Kongjan & Angelidaki (2010) y Saraphirom & Reungsang (2010) obtienen valores superiores a lo conseguido en este estudio. Sin embargo, la concentración de bioetanol alcanzada de 9.872 g/L (214.2898 mM) en nuestro trabajo, es aproximadamente 143 veces mayor que la reportada por Kongjan & Angelidaki (2010), la cual fue 1.5 mM. Lo que indica que son necesarias nuevas estrategias de ingeniería genética para aumentar la VPH, manteniendo la considerable producción de etanol.

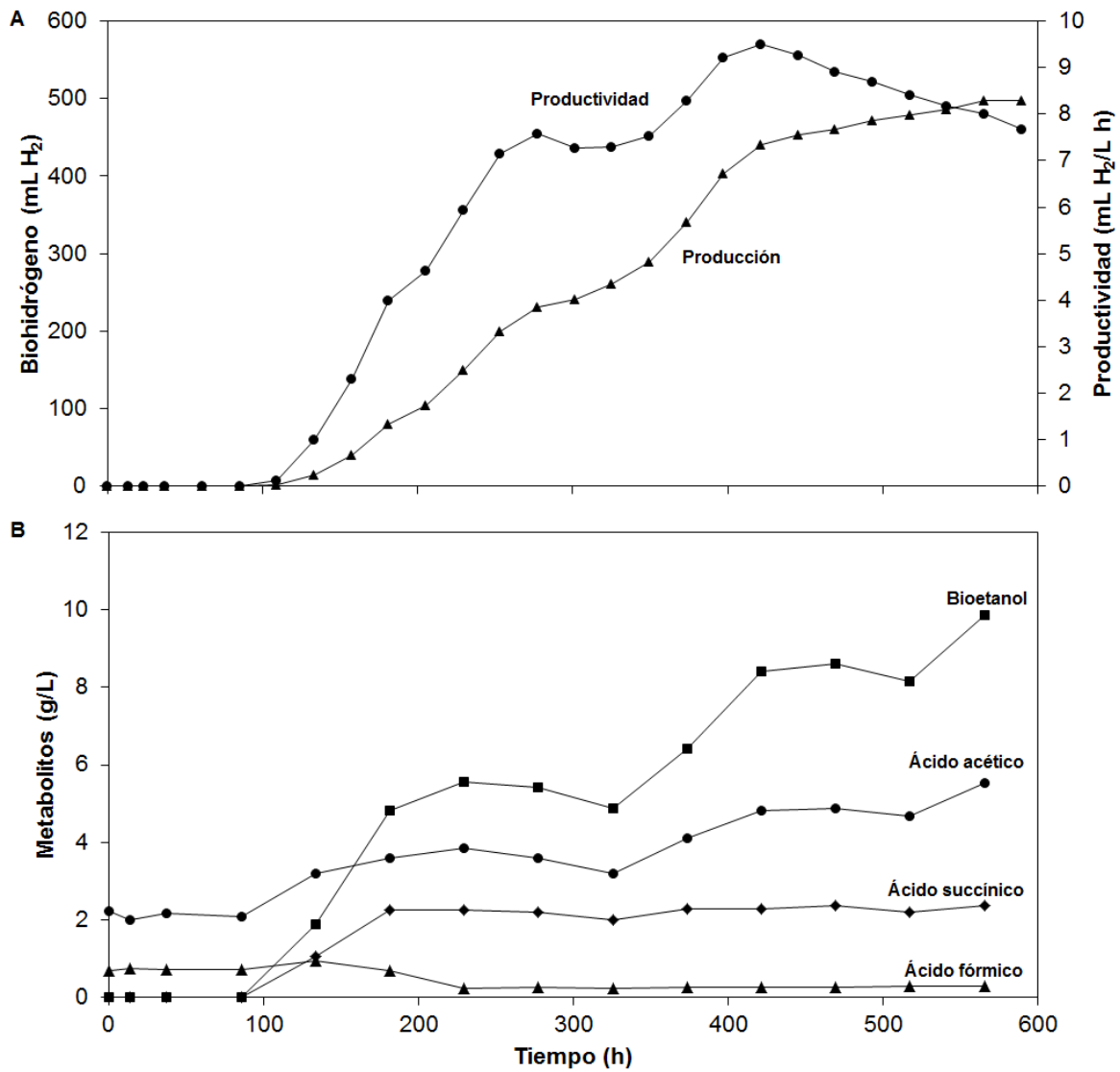


Fig. 4 (A) Producción y productividad de biohidrógeno bajo condiciones óptimas (pH 8.2, 31 °C y 23.4 g/L HPT). (B) Producción de metabolitos bajo condiciones óptimas, usando como fuente de carbono hidrolizado de paja de trigo.

Tabla 10 Comparación de rendimiento de biohidrógeno y VPH con diferentes sustratos y microorganismos

Materia prima	Microorganismo	Fermentación	^a Y _{H2}		^b VPH (mL H ₂ /L d)	Referencia
			mol H ₂ /mol azúcar	mL H ₂ /g azúcar		
Hidrolizado de paja de trigo	<i>E. coli</i> WDHL	Batch	1.68 ± 0.05	271.96 ± 7.80	228 ± 19.2	Este estudio
Hidrolizado de bagazo de caña	Cultivo mixto	Batch	1.48 ± 0.22	-	176.77 ± 0.22	Fangkum and Reungsang (2011)
Hidrolizado de bagazo de caña	<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	-	-	66.85* (6.01 mmol H ₂ /g azúcar)	131 (pretratamiento H ₃ PO ₄)	Lo et al. (2011)
		-	-	56.73* (5.1 mmol H ₂ /g azúcar)	100 (pretratamiento NaOH)	
Hidrolizado de paja de trigo	Cultivo mixto (termófilos)	CSTR	-	178.0 ± 10.1	184.0 ± 10.7	Kongjan et al. (2010)
Hidrolizado de <i>Miscanthus giganteus</i>	<i>C. saccharolyticus</i> DSM 8903	Batch	3.4 (mol H ₂ /mol hexosa)	-	-	de Vrije et al. (2009)
	<i>T. neapolitana</i> DSM 4359	Batch	2.4 (mol H ₂ /mol hexosa)	-	-	
Hidrolizado de paja de trigo	Cultivo mixto (termófilos)	UASB	-	212.0 ± 6.6	821.4 ± 25.5	Kongjan and Angelidaki (2010)
Hidrolizado de cáscara de arroz	<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Batch	-	213.57* (19.2 mmol H ₂ /g azúcar)	-	Lo et al. (2009)
Jarabe de sorgo dulce	Cultivo mixto	Batch	2.22 (mol H ₂ /mol hexosa)	-	1,239.84* (51.66 mL H ₂ /L h)	Saraphirom and Reungsang (2010)

^aY_{H2}: rendimiento de biohidrógeno; ^bVPH: velocidad de producción de biohidrógeno; * Convertido de datos originales

De acuerdo con la Fig. 4B el uso de hidrolizado de paja de trigo favorece la producción de etanol. El rendimiento obtenido fue 0.59 g EtOH/g C-HPT, el cual es mayor que 0.50 (Saha et al., 2011b), 0.48 (Saha et al., 2011a), 0.50 (Martinez et al., 2007) y 0.40 (Kim et al., 2011) g EtOH/g azúcar, alcanzados en otros estudios. Saha et al. (2011a) y Saha et al. (2011b) utilizan *E. coli* FBR5, con hidrolizado de paja de trigo como sustrato, realizando la fermentación a 35°C, con pH de 6.5 y 7.0, respectivamente. Kim et al. (2011) emplearon hidrolizados de algas marinas y *E. coli* KO11, a 30°C. Martinez et al. (2007) realizaron la fermentación a 37°C con *E. coli* B y un medio bajo en sales.

Las condiciones óptimas se probaron en un ensayo en biorreactor y los resultados se muestran en la Fig. 5A. A 200 horas de fermentación la producción fue de 3,177 mL H₂ (VPH: 369.240 mL H₂/L d), también se detectaron 8.86 g/L (0.64 g EtOH/g C-HPT) de bioetanol (Fig. 5B). En la Tabla 11 se observa la comparación con estudios sobre coproducción de biohidrógeno y bioetanol. En general, los rendimientos de ambos biocombustibles son mayores que los obtenidos en los otros trabajos, sin embargo, las velocidades de producción son bajas al compararlas con alcanzadas por Han et al. (2012) y Lay et al. (2012). Lo anterior se debe a que la cepa WDHL se modificó genéticamente por Rosales-Colunga et al. (2010) para metabolizar lactosa.

En la Fig. 5C se muestra el cambio de pH y potencial redox durante la fermentación. Observándose un decremento en el pH (8.2 – 4.31), debido a la acumulación de ácidos orgánicos (acético y succínico). El potencial redox decrece, de –316 a –520 mV, como resultado de la actividad metabólica (Rosales-Colunga et al., 2010).

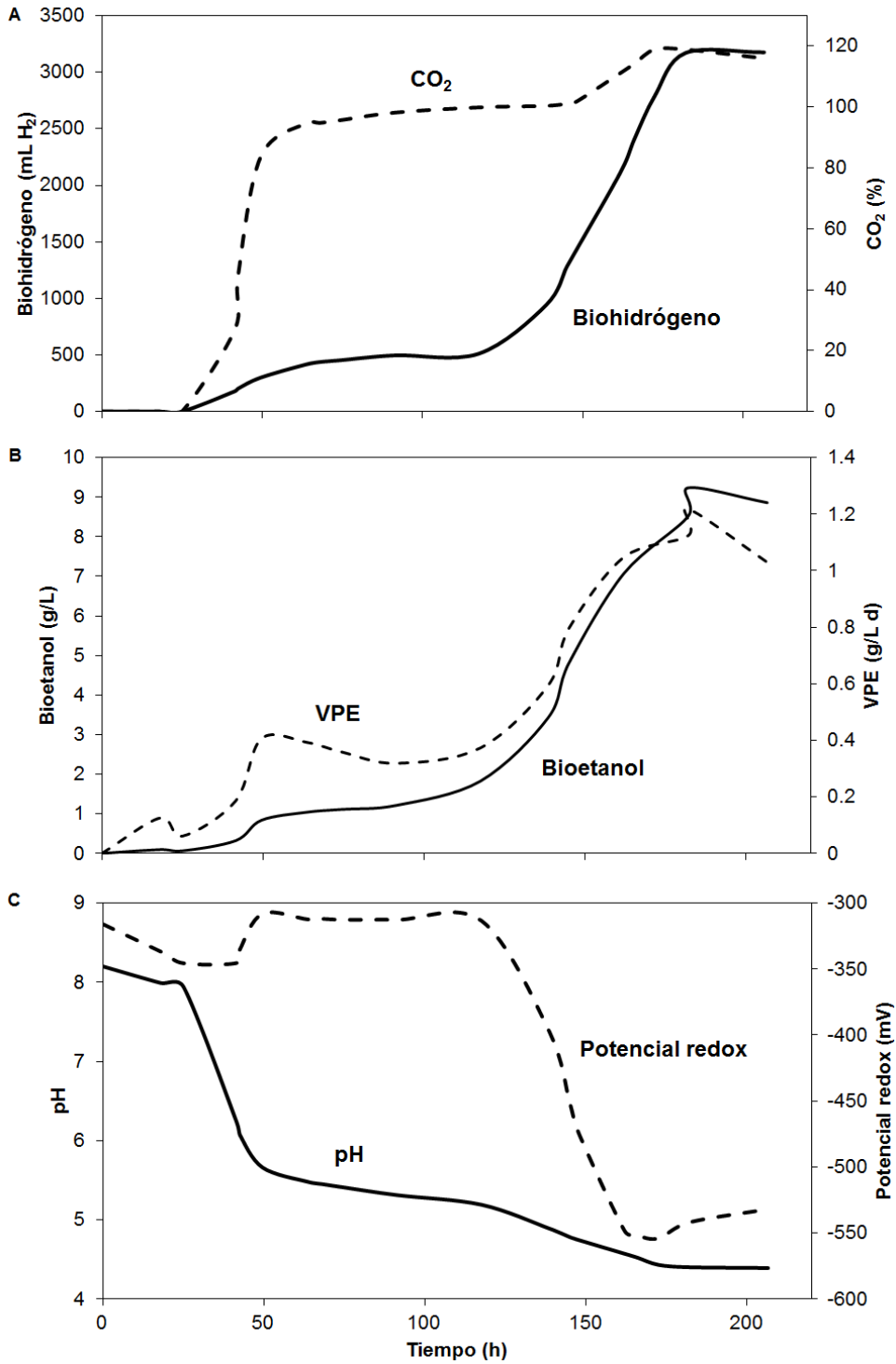


Fig. 5 (A) Cultivo en biorreactor por lote de *E. coli* WDHL en condiciones óptimas: 23.4 g/L de HPT, pH inicial de 8.2 y 31° C. (B) Producción y velocidad de producción (VPE) de bioetanol durante el cultivo en biorreactor en condiciones óptimas. (C) Cambio de pH y potencial redox durante el cultivo en biorreactor en condiciones óptimas.

Tabla 11 Comparación de rendimientos, velocidad de producción y concentración de biohidrógeno y bioetanol

^a Y _{H₂} mL H ₂ /g azúcar	^b VPH mL H ₂ /L d mmol H ₂ /L d		Concentración g/L	^c Y _{EtOH} g EtOH/g azúcar	^d VPE mol/L d	Referencia
218.636	369.240	33.195	8.86 192.322 mM	0.64	0.022	Este estudio
178	-	-	-	0.41	-	Kaparaju et al. (2009)
-	3,310.345*	297.6* (12.4 mmol/L h)	-	-	0.486* (20.27 mmol/L h)	Han et al. (2012)
80.265* (1.3 mol H ₂ /mol glucosa, pH 4.9)	-	-	-	0.31* (1.2 mol EtOH/mol glucosa , pH 6)	-	Karadag and Puhakka (2010)
49.394* (0.8 mol H ₂ /mol glucosa)	-	-	31.77 mM	-	-	Koskinen et al. (2008)
97.553* (1.58 mol H ₂ /mol glucosa)	-	-	-	0.230* (0.90 mol etanol/mol glucosa)	-	Zhao et al. (2009)
130.276* (2.11 mol H ₂ /mol glucosa)	-	-	1.942	-	-	Barros and Silva (2012)
51.246* (0.83 mol H ₂ /mol hexosa)	1,373.749*	123.5 (pH 7)	-	0.192* (0.75 mol EtOH/mol hexosa, pH6)	-	Lay et al. (2012)
-	64.071*	5.76* (0.24 mmol H ₂ /L d)	120 mM	-	-	Reungsang et al. (2013)
-	2,191	-	7.92	-	-	Varrone et al. (2012)

^aY_{H₂}: rendimiento de biohidrógeno

^bVPH: velocidad de producción de biohidrógeno

^cY_{EtOH}: rendimiento de bioetanol

^dVPE: velocidad de producción de bioetanol

* Convertido de datos originales

3.4 Determinación del efecto de la concentración de suero de leche e hidrolizado de paja de trigo en la producción y productividad de biohidrógeno

Debido a que la cepa WDHL está modificada genéticamente para consumir lactosa al inicio de la fermentación, el uso de suero de leche permitiría mejorar la productividad de biohidrógeno al utilizar mezclas con hidrolizado de paja de trigo. Los resultados para producción y productividad de biohidrógeno utilizando el diseño experimental Central Compuesto se observan en la Tabla 10. La producción obtenida por los puntos centrales (experimentos 4, 6, 8, 9 y 12) fue de 546 ± 91.5 mL H₂, y su productividad fue 22.4 ± 5.65 mL H₂/L h. Los puntos estrella (experimentos 3 y 5, con 21.3 g/L HPT y 21.3 g/L SL, respectivamente) presentan productividades menores a 15 mL H₂/L h. Los resultados son similares a los obtenidos por Rosales-Colunga et al. (2010), donde el sustrato fue únicamente suero de leche y la cepa WDHL.

Con el ANOVA (Tabla 11) se determinó que ninguno de los factores (HPT y SL) tiene efecto significativo sobre la producción, ya que la “SS Total” tiene un valor de 167,441.00 de los cuales el “SS Error” es 67,244.80, lo que representa el 40% de la variación total que hubo en la respuesta durante estos experimentos. Sin embargo, al realizar el análisis para la productividad (Tabla 12) se observa que es afectada por la concentración de SL, indicando así que la concentración de suero de leche mejora la velocidad de producción.

El modelo matemático que representa la productividad como una función de las variables evaluadas en la región experimental se expresa en la siguiente ecuación:

$$\text{Productividad (mL H}_2\text{/L h)} = -12.565 + 4.95373 \cdot \text{HPT} + 0.987863 \cdot \text{SL} - 0.120254 \cdot \text{HPT}^2 - 0.1088 \cdot \text{HPT} \cdot \text{SL} - 0.0126276 \cdot \text{SL}^2$$

La superficie de respuesta obtenida con éste modelo se muestra en la Fig. 6, las mejores condiciones para aumentar la productividad de biohidrógeno son 16.7 g/L HPT y 8.7 g/L SL.

Tabla 12 Resultados de producción y productividad de biohidrógeno, del diseño experimental Central Compuesto, usando como fuente de carbono mezclas de hidrolizado de paja de trigo y suero de leche.

Experimento	Producción (mL H₂)	Productividad (mL H₂/L h)
1	538.9	27.438
2	390.2	21.495
3	327	11.233
4	643.2	29.658
5	350.5	13.195
6	654	28.949
7	387.3	25.541
8	435.5	18.096
9	525.8	17.530
10	373.4	12.964
11	425.5	17.507
12	453.6	17.734
13	657.7	27.824

Tabla 13 Análisis de varianza para la producción de biohidrógeno, usando como fuente de carbono mezclas de hidrolizado de paja de trigo y suero de leche.

Fuente	SS^a	GI^b	MS^c	Razón-F	Valor-P
HPT	2,679.07	1	2,679.07	0.28	0.6138
SL	32,987.10	1	32,987.10	3.43	0.1063
HPT ²	34,993.40	1	34,993.40	3.64	0.0980
HPT•SL	25,536.00	1	25,536.00	2.66	0.1470
SL ²	4,000.71	1	4,000.71	0.42	0.5393
Error total	67,244.80	7	9,606.40		
Total (corr.)	167,441.00	12			

^a Suma de cuadrados

^b Grados de libertad

^c Cuadrado medio

Tabla 14 Análisis de varianza para ajustar el modelo de la productividad de biohidrógeno, usando como fuente de carbono mezclas de hidrolizado de paja de trigo y suero de leche.

Fuente	SS^a	GL^b	MS^c	Razón-F	Valor-P
HPT	14.7354	1	14.7354	0.5	0.501
SL	188.653	1	188.653	6.44	0.0388
HPT ²	46.5969	1	46.5969	1.59	0.2475
HPT•SL	29.5963	1	29.5963	1.01	0.3482
SL ²	0.513808	1	0.513808	0.02	0.8983
Error total	204.033	7	29.2772		
Total	485.033	12			

^a Suma de cuadrados

^b Grados de libertad

^c Cuadrado medio

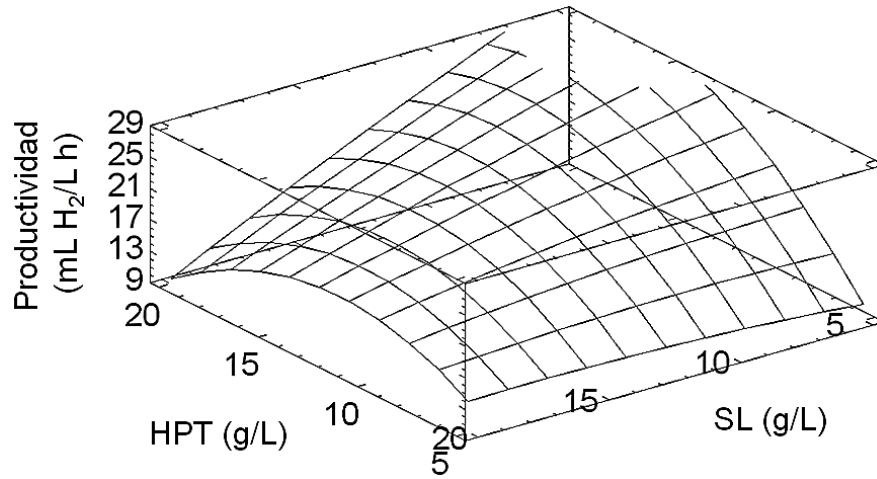


Fig. 6 Superficie de respuesta para productividad de biohidrógeno.

Conclusiones

La coproducción de biohidrógeno y bioetanol a partir de hidrolizado de paja de trigo por *E. coli* WDHL, fue exitosa, ya que ésta metaboliza los carbohidratos presentes en el sustrato. Además, se obtienen rendimientos de 218.2 mL H₂/g C-HPT y 0.61 g EtOH/g C-HPT. Con el análisis estadístico se logró determinar que las variables importantes del proceso son la temperatura y el pH, y mediante la metodología de superficies de respuesta se determinaron las condiciones óptimas para maximizar la respuesta. Dichas condiciones son 23.4 g/L de hidrolizado de paja de trigo, 31°C y pH inicial 8.2.

Se evaluó el efecto que tienen las concentraciones de hidrolizado de paja de trigo y suero de leche, al usar mezclas de estos sustratos como fuente de carbono, determinándose que el uso de mezclas no afecta la producción de biohidrógeno; es decir, se pueden mezclar los sustratos en cualquier proporción, o bien usar sólo uno de ellos y la producción será similar. Esto pudiera explicarse considerando que ambos sustratos tienen carbohidratos metabolizables (suero de leche: lactosa; hidrolizado de paja de trigo: glucosa, xilosa, arabinosa) por la cepa utilizada. Sin embargo, existe un efecto sobre la productividad, ya que al añadir suero de leche es posible mejorarla. Las productividades obtenidas son similares a estudios realizadas con la cepa WDHL. El efecto del suero de leche sobre la productividad se explica porque esta cepa está modificada genéticamente para que asimile rápidamente lactosa mediante la eliminación del represor *lacI*.

Este trabajo enriquece la información acerca de la coproducción de biocombustibles de segunda generación, es decir, usando hidrolizados lignocelulósicos. Faltando por realizar estrategias que permitan la coproducción de biohidrógeno y bioetanol, aumentando su velocidad de producción, pero sin afectar los rendimientos alcanzados.

Referencias

Barros, A.R., and Silva, E.L. (2012). Hydrogen and ethanol production in anaerobic fluidized bed reactors: Performance evaluation for three support materials under different operating conditions. *Biochemical Engineering Journal* 61, 59-65.

Cheng, C.L., Lo, Y.C., Lee, K.S., Lee, D.J., Lin, C.Y., and Chang, J.S. (2011). Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock. *Bioresource technology* 102, 8514-8523.

Chong, M.-L., Abdul Rahman, N.A., Rahim, R.A., Aziz, S.A., Shirai, Y., and Hassan, M.A. (2009). Optimization of biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent using response surface methodology. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 7475-7482.

Das, D., and Veziroglu, T. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 6046-6057.

Davila-Vazquez, G., Alatríste-Mondragón, F., de León-Rodríguez, A., and Razo-Flores, E. (2008). Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 4989-4997.

Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C.B., Rosales-Colunga, L.M., de León-Rodríguez, A., and Razo-Flores, E. (2009). Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 4296-4304.

Davila-Vazquez, G., de León-Rodríguez, A., Alatríste-Mondragón, F., and Razo-Flores, E. (2011). The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. *Biomass and Bioenergy* 35, 3174-3181.

de Vrije, T., Bakker, R.R., Budde, M.A., Lai, M.H., Mars, A.E., and Claassen, P.A. (2009). Efficient hydrogen production from the lignocellulosic energy crop

Miscanthus by the extreme thermophilic bacteria *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*. *Biotechnology for biofuels* 2, 12.

Demirbas, A. (2009). *Biohydrogen For Future Engine Fuel Demands*. (London New York: Springer).

Fangkum, A., and Reungsang, A. (2011). Biohydrogen production from mixed xylose/arabinose at thermophilic temperature by anaerobic mixed cultures in elephant dung. *International Journal of Hydrogen Energy* 36, 13928-13938.

Grahovac, J., Dodić, J., Jokić, A., Dodić, S., and Popov, S. (2012). Optimization of ethanol production from thick juice: A response surface methodology approach. *Fuel* 93, 221-228.

Guimaraes, P.M., Teixeira, J.A., and Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology advances* 28, 375-384.

Han, W., Chen, H., Jiao, A., Wang, Z., Li, Y., and Ren, N. (2012). Biological fermentative hydrogen and ethanol production using continuous stirred tank reactor. *International Journal of Hydrogen Energy* 37, 843-847.

Kaparaju, P., Serrano, M., Thomsen, A.B., Kongjan, P., and Angelidaki, I. (2009). Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresource technology* 100, 2562-2568.

Karadag, D., and Puhakka, J.A. (2010). Direction of glucose fermentation towards hydrogen or ethanol production through on-line pH control. *International Journal of Hydrogen Energy* 35, 10245-10251.

Kim, N.J., Li, H., Jung, K., Chang, H.N., and Lee, P.C. (2011). Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11. *Bioresource technology* 102, 7466-7469.

Kongjan, P., and Angelidaki, I. (2010). Extreme thermophilic biohydrogen production from wheat straw hydrolysate using mixed culture fermentation: Effect of reactor configuration. *Bioresource technology* 101, 7789-7796.

Kongjan, P., S, O.T., Kotay, M., Min, B., and Angelidaki, I. (2010). Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture. *Biotechnology and bioengineering* 105, 899-908.

Koskinen, P.E., Beck, S.R., Orlygsson, J., and Puhakka, J.A. (2008). Ethanol and hydrogen production by two thermophilic, anaerobic bacteria isolated from Icelandic geothermal areas. *Biotechnology and bioengineering* 101, 679-690.

Lay, C.-H., Lin, H.-C., Sen, B., Chu, C.-Y., and Lin, C.-Y. (2012). Simultaneous hydrogen and ethanol production from sweet potato via dark fermentation. *Journal of Cleaner Production* 27, 155-164.

Lo, Y.-C., Saratale, G.D., Chen, W.-M., Bai, M.-D., and Chang, J.-S. (2009). Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and Microbial Technology* 44, 417-425.

Lo, Y.-C., Su, Y.-C., Cheng, C.-L., and Chang, J.-S. (2011). Biohydrogen production from pure and natural lignocellulosic feedstock with chemical pretreatment and bacterial hydrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy* 36, 13955-13963.

Martinez, A., Grabar, T.B., Shanmugam, K.T., Yomano, L.P., York, S.W., and Ingram, L.O. (2007). Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnology letters* 29, 397-404.

Miller, E.N., Jarboe, L.R., Turner, P.C., Pharkya, P., Yomano, L.P., York, S.W., Nunn, D., Shanmugam, K.T., and Ingram, L.O. (2009). Furfural inhibits growth by limiting sulfur assimilation in ethanologenic *Escherichia coli* strain LY180. *Applied and environmental microbiology* 75, 6132-6141.

Mills, T.Y., Sandoval, N.R., and Gill, R.T. (2009). Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. *Biotechnology for biofuels* 2, 26.

Oehlert, G.W. (2010). *A first course in design and analysis of experiments*.

Pan, C.M., Fan, Y.T., Xing, Y., Hou, H.W., and Zhang, M.L. (2008). Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium sp. Fanp2*. *Bioresource technology* 99, 3146-3154.

Petersson, A., Thomsen, M., Hauggaardnielsen, H., and Thomsen, A. (2007). Potential bioethanol and biogas production using lignocellulosic biomass from winter rye, oilseed rape and faba bean. *Biomass and Bioenergy* 31, 812-819.

Rai, P.K., Singh, S.P., and Asthana, R.K. (2012). Biohydrogen production from cheese whey wastewater in a two-step anaerobic process. *Applied biochemistry and biotechnology* 167, 1540-1549.

Reungsang, A., Sittijunda, S., and Angelidaki, I. (2013). Simultaneous production of hydrogen and ethanol from waste glycerol by *Enterobacter aerogenes* KKU-S1. *International Journal of Hydrogen Energy* 38, 1813-1825.

Rosales-Colunga, L.M., Razo-Flores, E., Ordoñez, L.G., Alatraste-Mondragón, F., and De León-Rodríguez, A. (2010). Hydrogen production by *Escherichia coli* Δ hycA Δ lacl using cheese whey as substrate. *International Journal of Hydrogen Energy* 35, 491-499.

Rubin, E.M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454, 841-845.

Saha, B.C., Nichols, N.N., and Cotta, M.A. (2011a). Ethanol production from wheat straw by recombinant *Escherichia coli* strain FBR5 at high solid loading. *Bioresource technology* 102, 10892-10897.

Saha, B.C., Nichols, N.N., Qureshi, N., and Cotta, M.A. (2011b). Comparison of separate hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and fermentation processes for ethanol production from wheat straw by recombinant *Escherichia coli* strain FBR5. *Applied microbiology and biotechnology* 92, 865-874.

Saraphirom, P., and Reungsang, A. (2010). Optimization of biohydrogen production from sweet sorghum syrup using statistical methods. *International Journal of Hydrogen Energy* 35, 13435-13444.

SCFI (1970). NMX-V-4-1970. Norma Oficial de Método de prueba para la determinación de furfural en bebidas alcohólicas destiladas. (México, D.F.).

Varrone, C., Giussani, B., Izzo, G., Massini, G., Marone, A., Signorini, A., and Wang, A. (2012). Statistical optimization of biohydrogen and ethanol production from crude glycerol by microbial mixed culture. *International Journal of Hydrogen Energy* 37, 16479-16488.

Zhao, C., O-Thong, S., Karakashev, D., Angelidaki, I., Lu, W., and Wang, H. (2009). High yield simultaneous hydrogen and ethanol production under extreme-thermophilic (70°C) mixed culture environment. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 5657-5665.

Anexo

Determinación de furfural (método espectrofotométrico)

Solución patrón

Se pesa exactamente 0.1 g de furfural y se diluye en alcohol etílico de 95% aforando a 10 mL, tomar 100 µL de la solución anterior y aforar a 10 mL con alcohol etílico al 50%, la concentración de esta solución es de 100 mg/L.

Procedimiento

Tomar 1 mL de la muestra y aforar a 5 mL con alcohol etílico al 50%. Añadir 100 µL de anilina y agitar, posteriormente, agregar 50 µL de ácido clorhídrico concentrado y agitar. Colocar la muestra en un baño de agua a 15°C durante 30 minutos. Medir la absorbancia a una longitud de onda de 520 nm. La concentración de furfural en la muestra se obtiene mediante la siguiente expresión:

$$F = 5 \times F_i$$

En donde:

F = concentración de furfural en la muestra (mg/L)

F_i = concentración obtenida directamente de la curva

5 = factor de dilución

Curva de calibración

Preparar diluciones que contengan 1, 2, 3, 4 y 5 mg furfural/L. Para ello tomar de la solución patrón 50, 100, 150, 200 y 250 µL y aforarlos a 5 mL con alcohol etílico al 50%. Tratar cada dilución tal y como se indica en el procedimiento. Graficar concentración contra absorbancia y obtener la curva.