



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La universidad Católica de Loja

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

**Crecimiento, consumo y producción de hidrógeno con
Clostridium acetobutylicum a partir de fructosa como fuente
de carbono y energía**

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de:

INGENIERA AMBIENTAL

Autora: Vásquez Cabrera, Adriana Gabriela

Director: Aguirre Chamba, Paulina Isabel

LOJA

2025



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2025

Aprobación del director del Trabajo de Integración Curricular

Loja, 10 de marzo de 2025

Magíster

Mercedes Villa Achupallas

Directora de la carrera de Ingeniería Ambiental

Ciudad. –

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Integración Curricular denominado: Crecimiento, consumo y producción de hidrógeno con *Clostridium acetobutylicum* a partir de fructosa como fuente de carbono y energía realizado por Adriana Gabriela Vásquez Cabrera ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Director: Paulina Isabel Aguirre Chamba, magíster

C.I.: 1104265226

Correo electrónico: piaguirre@utpl.edu.ec

Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, Adriana Gabriela Vásquez Cabrera, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autora del Trabajo de Integración Curricular denominado: Crecimiento, consumo y producción de hidrógeno con *Clostridium acetobutylicum* a partir de fructosa como fuente de carbono y energía, de la carrera de Ingeniería Ambiental, específicamente de los contenidos comprendidos en: introducción, marco teórico, materiales y métodos, resultados, discusión, conclusiones y recomendaciones, siendo Paulina Isabel Aguirre Chamba, directora del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”, en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

.....

Autor: Adriana Gabriela Vásquez Cabrera

C.I.: 1150690665

Correo electrónico: agvasquezcabrera@utpl.edu.ec

Dedicatoria

A mis padres que con tanto esfuerzo y amor permitieron que lograré cumplir este objetivo y a todas aquellas personas que en un algún momento fueron parte fundamental de este proceso.

Agradecimiento

Agradezco a Dios por darme la fortaleza, la constancia y abrirme oportunidades para adquirir nuevas experiencias y conocer personas.

A mi familia, en especial a mis padres y hermano, agradezco su apoyo, paciencia y disposición para escucharme, incluso sin comprender de qué trataba mi trabajo investigativo, siempre estuvieron prestos a compartir conmigo y darme palabras de aliento.

A mi tutora de tesis Dr. Paulina Aguirre cuya experiencia y paciencia fueron fundamentales para la realización de este trabajo.

A mis docentes que me enseñaron y transmitieron sus conocimientos para fortalecer mi desarrollo profesional, en especial al ingeniero Diego Maza por brindarme su apoyo a lo largo de mi carrera. También agradezco a docentes de distintas áreas que siempre estuvieron prestos a solventaban mis dudas.

Finalmente agradezco a mis amigos y compañeros, con los cuales hemos compartido muchos momentos no solo de aprendizaje, sino de alegrías y tristezas.

Gracias a cada uno de ustedes por ser parte de este proceso.

Índice de contenido

Carátula	I
Aprobación del director del Trabajo de Integración Curricular	II
Declaración de autoría y cesión de derechos	III
Dedicatoria.....	V
Agradecimiento	VI
Índice de contenido	VII
Índice de tablas	X
Índice de Figuras	XI
Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción	3
Capítulo uno	5
Marco Teórico.....	5
1.1 Hidrógeno	5
1.1.1 Fuente de energía.....	5
1.1.2 Producción biológica de hidrógeno.....	6
1.1.3 Rendimiento teórico de producción de biohidrógeno en bacterias acidogénicas .	7
1.2 Clostridium acetobutylicum.....	8
1.2.1 Clostridium acetobutylicum degenerado y silvestre	9
1.2.2 Cinética de crecimiento microbiano	9
1.2.3 Ácidos orgánicos.....	10
1.3 Fuentes de carbono.....	10
1.3.1 Fuentes económicas de fructosa	11
Capítulo dos	14
Materiales y métodos	14

2.1	Selección de fructosa como fuente de carbono y energía	14
2.2	Activación y propagación de la cepa de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	14
2.2.1	<i>Trasposos sucesivos</i>	15
2.2.2	<i>Cinética de crecimiento</i>	16
2.3	Metodologías analíticas	16
2.3.1	<i>Determinación de hidrógeno producido</i>	16
2.3.2	<i>Determinación de biomasa y azúcar</i>	16
2.4	Cinética de crecimiento de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	17
2.5	Cálculo del rendimiento teórico de producción de biohidrógeno.....	17
2.6	Cálculos para la determinación de la tasa volumétrica de productividad de hidrógeno.....	17
2.7	Cálculo para determinar la velocidad máxima de crecimiento	18
2.8	Cálculo para el rendimiento de biomasa	18
2.9	Análisis estadístico	18
	Capítulo tres	20
	Resultados	20
3.1	Análisis de los resultados	20
3.1.1	<i>Adaptación de Clostridium acetobutylicum en medio RCM a diferentes concentraciones de fructosa</i>	20
3.1.2	<i>Cinética de crecimiento de Clostridium acetobutylicum en medio RCM (Reinforced clostridial medium) variando las concentraciones de fructosa</i>	24
3.1.3	<i>Análisis estadístico de producción de gas, concentración celular y consumo de azúcar en la cinética de crecimiento</i>	30
3.1.4	<i>Velocidad máxima de crecimiento Clostridium acetobutylicum variando la concentración de azúcar</i>	33

3.1.5 Rendimiento de biomasa de <i>Clostridium acetobutylicum</i> variando la concentración de azúcar.....	35
3.1.6 Volumen de hidrógeno teórico y práctico obtenido en la cinética de <i>Clostridium acetobutylicum</i> variando la concentración de azúcar	36
3.1.7 Tasa de producción de hidrógeno.....	38
3.1.8 Rendimiento práctico de hidrógeno usando fructosa como fuente de carbono... 38	38
3.2 Discusión de los resultados.....	39
Conclusiones.....	43
Recomendaciones	44
Referencias.....	45
Apéndice	55
Apéndice A. Curva de calibración de azúcares reductores por el método del ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS).....	55
Apéndice B. Determinación de concentración celular	57
Apéndice C. Memoria de cálculos	60
Apéndice D. Análisis estadístico	66

Índice de tablas

Tabla 1 Selectividad de los cultivos agrícolas	12
Tabla 2 Análisis de costos y establecimiento de precios para residuos agrícolas en Ecuador	14
Tabla 3 Composición del medio de cultivo RCM modificado.....	15
Tabla 4 Velocidad máxima de crecimiento en diferentes concentraciones	34
Tabla 5 Rendimiento global de biomasa a partir de sustrato consumido	35
Tabla 6 Productividad de hidrógeno en las distintas concentraciones.....	38
Tabla 7 Moles de azúcar y de hidrógeno junto con el rendimiento de producción obtenidos en cada una de las concentraciones	39

Índice de Figuras

Figura 1 Producción de gas de <i>Clostridium acetobutylicum</i> en función del número de traspasos	20
Figura 2 Crecimiento celular de <i>Clostridium acetobutylicum</i> en función del número de traspasos	22
Figura 3 Concentración de azúcar de <i>Clostridium acetobutylicum</i> en función del número de traspasos	23
Figura 4 Producción de gas de <i>Clostridium acetobutylicum</i> con 1 g·L ⁻¹ de fructosa	24
Figura 5 Concentración celular de <i>Clostridium acetobutylicum</i> con 1 g·L ⁻¹ de fructosa ..	25
Figura 6 Consumo de azúcar de <i>Clostridium acetobutylicum</i> con 1 g·L ⁻¹ de fructosa	26
Figura 7 Producción de gas de <i>Clostridium acetobutylicum</i> con 2,5 g·L ⁻¹ de fructosa	27
Figura 8 Concentración celular de <i>Clostridium acetobutylicum</i> con 2,5 g·L ⁻¹ de fructosa	27
Figura 9 Consumo de azúcar de <i>Clostridium acetobutylicum</i> con 2,5 g·L ⁻¹ de fructosa ...	28
Figura 10 Producción de gas de <i>Clostridium acetobutylicum</i> con 5 g·L ⁻¹ de fructosa	29
Figura 11 Concentración celular de <i>Clostridium acetobutylicum</i> con 5 g·L ⁻¹ de fructosa	29
Figura 12 Consumo de azúcar de <i>Clostridium acetobutylicum</i> con 5 g·L ⁻¹ de fructosa	30
Figura 13 Diagrama de cajas para producción de gas en función de las variables de concentración y la cepa empleada	31
Figura 14 Diagrama de cajas para concentración de biomasa en función de las variables de concentración y la cepa empleada	32
Figura 15 Diagrama de cajas para concentración de azúcar en función de las variables de concentración y la cepa empleada	33
Figura 16 Volumen de hidrógeno teórico y práctico de <i>Clostridium acetobutylicum</i> con 1 g·L ⁻¹ de fructosa.....	37

Resumen

En esta investigación se evaluó el crecimiento, consumo y producción de hidrógeno con *Clostridium acetobutylicum* utilizando fructosa como fuente de carbono y energía, el hidrógeno se obtuvo por procesos biológicos basados en la fermentación anaeróbica, para lo cual se preparó el medio de cultivo RCM con tres concentraciones de fructosa (1; 2,5 y 5 g·L⁻¹), cada frasco se llenó con un volumen de trabajo de 30 mL y se inóculo con el equivalente al 10 %V/V. Durante la fermentación se midieron parámetros como: producción de gas, crecimiento celular y consumo de azúcar. En base a la caracterización cinética, los resultados reflejaron que la bacteria logra metabolizar la fructosa, sin embargo, el rendimiento experimental de hidrógeno fue inferior al teórico, siendo de 0,870 moles de H₂·mol de fructosa⁻¹ para la concentración de 1 g·L⁻¹; 0,936 moles de H₂·mol de fructosa⁻¹ para la segunda concentración y 0,638 moles de de H₂·mol de fructosa⁻¹ para la tercera concentración. La mayor producción volumétrica de hidrógeno se alcanzó en la concentración de 2,5 g·L⁻¹ con un volumen de 1,73·10⁻² L·L⁻¹ h⁻¹ de hidrógeno.

Palabras claves: Fermentación oscura; *Clostridium acetobutylicum*; hidrógeno

Abstract

In this research the growth, consumption and production of hydrogen with *Clostridium acetobutylicum* using fructose as a carbon and energy source was evaluated, hydrogen was obtained by biological processes based on anaerobic fermentation, for which the RCM culture medium was prepared with three concentrations of fructose (1; 2,5 y 5 g·L⁻¹), each flask was filled with a working volume of 30 mL and inoculated with the equivalent of 10 %V/V. During fermentation, parameters such as: gas production, cell growth and sugar consumption were measured. Based on the kinetic characterization, the results reflected that the bacteria succeeded in metabolizing fructose, however, the experimental hydrogen yield was lower than the theoretical one, I feel 0.870 moles of H₂·mol of fructose⁻¹ for the concentration of 1 g·L⁻¹; 0.936 moles of H₂·mol of fructose⁻¹ for the second concentration and 0.638 moles of H₂/mol of fructose for the third concentration. The highest volumetric hydrogen production was achieved at the 2,5 g·L⁻¹ concentration with a volume of 1,73·10⁻² L·L⁻¹ h⁻¹ of hydrogen.

Keywords: dark fermentation; *Clostridium acetobutylicum*; hydrogen.

Introducción

El crecimiento demográfico descontrolado a nivel mundial ha generado un aumento significativo en el consumo de recursos naturales y fósiles (Coloma, 2024) generando preocupación por el agotamiento de recursos, el aumento de los precios de los combustibles fósiles y las preocupaciones relacionadas con los impactos ambientales, como la emisión de gases de efecto invernadero y la lluvia ácida (Brito & Martins, 2017; Hassan et al., 2015). Por ende, se ha llevado a una búsqueda activa de energías alternativas destacando los biocombustibles renovables, como el hidrógeno, el etanol, el butanol y el biodiésel como posibles soluciones.

El hidrógeno, a diferencia de los combustibles fósiles, no está fácilmente disponible en la naturaleza. Sin embargo, se puede producir a partir agua, gas natural y carbón (Towler, 2014) como fuentes de energía primaria a través de diferentes tecnologías como electrólisis del agua, el reformado de hidrocarburos, la gasificación y la separación termoquímica (Momirlan & Veziroglu, 2005; Nikolaidis & Poullikkas, 2017).

En la búsqueda de un proceso más sostenible, el uso de fuentes de carbono surge como una alternativa viable en el proceso de producción de biohidrógeno por fermentación anaeróbica, ya que puede utilizar como sustrato varios tipos de residuos industriales y domésticos ricos en carbohidratos como cáscara de plátano, bagazo de agave, bagazo de caña de azúcar, minimizando los problemas causados por la eliminación inadecuada de estos materiales y los costos asociados con el tratamiento previo de los sustratos (Lopes & Abreu, 2020; Valdez et al., 2019).

Este proceso es el fundamento de esta investigación, ya que el hidrógeno puede ser generado a partir de carbohidratos simples por diversas cepas bacterianas (Guiltinan et al., 2009), donde destaca la especie *Clostridium acetobutylicum* los cuales tienen la capacidad de producir este gas como un subproducto de su metabolismo (López, 2022).

Clostridium acetobutylicum es una bacteria anaeróbica con potencial prometedor como productora de biohidrógeno, es capaz de utilizar variedad de sustratos orgánicos ricos en energía para producir hidrógeno y obtener otros productos valiosos como butanol, acetona y etanol (Abd-Alla & El-Enany, 2012; Chong et al., 2009; Morsy et al., 2011; Singh et al., 2013).

Dentro de estos sustratos, la fructosa un carbohidrato clasificado en el grupo de las cetohechosas comúnmente conocido como el azúcar de fruta, se encuentra en gran cantidad en frutas, miel y verduras, su estructura química está compuesta de seis átomos de carbono (Castillo et al., 2003; Truong et al., 2022). Su captación y el catabolismo de la fructosa por *C. acetobutylicum*, no ha sido muy estudiada, a pesar de ello se utilizan sistemas de fosfotransferasa dependientes de fosfoenolpiruvato para captar la glucosa y la fructosa de estos monosacáridos (Voigt et al., 2014).

La producción de hidrógeno por *C. acetobutylicum* depende de la tasa de crecimiento y de la fase metabólica (Kashket & Zhi, 1995). Cuando se utiliza glucosa como sustrato, se alcanza un rendimiento máximo teórico de 6 moles de H₂ por 4 moles de glucosa consumida, considerando la generación de biomasa, el metabolismo de la glucosa y de la síntesis de ácidos orgánicos (Chen & Mortenson, 1974; Chen et al., 2006; Sinha & Pandey, 2011; Uyeda & Rabinowitz, 1971).

Por lo antes mencionado, este trabajo se basó en la caracterización cinética del crecimiento de *Clostridium acetobutylicum* utilizando fuentes alternas de carbono y energía, con el fin de evaluar su potencial como productor de biohidrógeno, para lo cual se realizó una búsqueda bibliográfica de fuentes económicas de fructosa como sustrato, luego se realizó la caracterización cinética empleando la fructosa y posterior a ello se determinó la productividad específica y volumétrica del hidrógeno molecular.

Capítulo uno

Marco Teórico

1.1 Hidrógeno

El hidrógeno es un gas incoloro, inodoro, insípido y no tóxico bajo condiciones normales, con un peso molecular de $2,016 \text{ g mol}^{-1}$, es el elemento más ligero, posee una densidad 14 veces menor que el aire (0.08376 Kg/cm^3 a condiciones estándares de presión y temperatura). El hidrógeno se encuentra en fase líquida por debajo de $20,3 \text{ K}$ a presión atmosférica (Martínez, 2015) Es el elemento más abundante del universo y el tercero más abundante en la tierra. Sin embargo, al no encontrarse en su estado puro en nuestro planeta debe ser producido a través de variados procesos (Cancino, 2021).

1.1.1 Fuente de energía

Entre las diversas fuentes de energía alternativas, el hidrógeno (H_2) ha surgido como un candidato prometedor entre los portadores energéticos del futuro (López, 2022) debido a su alto rendimiento energético ($122\text{-}142 \text{ KJ/g}$) (Mahecha, 2018), superando 2,75 veces al de los hidrocarburos, y a su capacidad para producir electricidad. Su aplicabilidad lo hace valioso en diversas industrias, desde la química hasta la energética (Martinez et al., 2021). Además, presenta un poder calorífico de $141,90 \text{ MJ/Kg}$ (Martínez, 2015).

Este recurso presenta una serie de ventajas significativas, siendo altamente eficiente, factible a cualquier escala y generando únicamente agua y calor como subproductos (Rivera, 2016).

En la actualidad, el hidrógeno representa menos del 2% del suministro total de energía primaria en el mundo y de los 65 millones de toneladas producidas al año equivalente a 8 Exajoule (EJ), el 96% proviene de fuentes no sostenibles (Sánchez & Silva, 2009). La producción de hidrógeno renovable se puede realizar utilizando agua como materia prima mediante procesos como la electrólisis, la termólisis y la fotólisis; además de emplear diferentes tipos de residuos

como sustratos para el proceso de biofotólisis, fermentación oscura y fotofermentación (Nikolaidis & Poullikkas, 2017). Dentro de las diversas técnicas de obtención de hidrógeno la bioproducción destaca por su potencialmente ilimitada disponibilidad ya que implica la generación de hidrógeno a partir de organismos vivos, ya sea mediante exposición a la luz solar o a través de procesos de fermentación oscura (Rivera, 2016). Esta última es una de las técnicas más estudiadas, mediante el uso de bacterias fermentativas anaeróbicas (Masset et al., 2012).

1.1.2 Producción biológica de hidrógeno

La producción de hidrógeno a través de microorganismos, como bacterias y algas, es posible gracias a procesos biológicos específicos (Cancino, 2021). La producción biológica de hidrógeno es de gran interés debido a su potencial para reducir el impacto ambiental negativo, además de que se necesita menos energía durante el proceso de producción gracias a que las temperaturas usadas durante los procesos biológicos son menores que las usadas con procesos convencionales (Bundhoo & Mohee, 2016). Además, utilizan recursos energéticos renovables e inagotables y contribuyen al aprovechamiento de residuos, ya que también pueden utilizar una variedad de materiales de desecho como materia prima (Das & Veziroğlu, 2001).

Los principales procesos biológicos utilizados para la producción de hidrógeno son la biofotólisis directa e indirecta, la fotofermentación y la fermentación oscura (Nikolaidis & Poullikkas, 2017). La biofotólisis implica la disociación del agua utilizando fotones principalmente a través de las plantas y algas como catalizadores biológicos (García, 2021). En la fotofermentación la luz se utiliza como fuente de energía para la fotosíntesis, tiene la ventaja de que la luz puede sustituir a los azúcares como fuente de energía, reduciendo así la competencia por el uso de la tierra con los cultivos alimentarios (Baeyens et al., 2020). Por último, la fermentación oscura, donde diversas bacterias anaerobias o facultativas descomponen los desechos orgánicos ricos en carbohidratos para producir hidrógeno, dióxido de carbono y ácidos orgánicos volátiles (Rezaeitavabe et al., 2020).

1.1.3 Rendimiento teórico de producción de biohidrógeno en bacterias acidogénicas

El género *Clostridium* es ampliamente utilizado como modelo para determinar los rendimientos máximos teóricos de hidrógeno obtenidos a partir de la metabolización de diferentes carbohidratos bajo condiciones anaeróbicas. Por ello, se puede relacionar el uso de fructosa para el cálculo del rendimiento de hidrógeno debido a que la fructosa posee la misma fórmula molecular que la glucosa ($C_6H_{12}O_6$) y puede ser empleada de manera similar en los procesos metabólicos llevados a cabo por *Clostridium*.

Según (Chen et al., 2006) la generación de biomasa a partir de glucosa puede representarse mediante la ecuación (1):

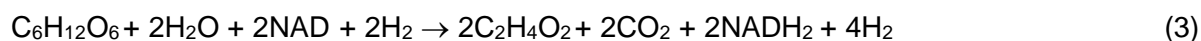


Donde $C_4H_7O_2N$ representa la composición teórica elemental de la biomasa. La glucosa es frecuentemente utilizada como fuente de carbono modelo, siendo metabolizada por la vía de Embden-Meyerhof que convierte la glucosa en piruvato generando NADH a partir de NAD^+ , el piruvato posteriormente se transforma en acetil-CoA y dióxido de carbono mediante la acción de la enzima piruvato-ferredoxina-oxireductasa (Uyeda & Rabinowitz, 1971). Este proceso requiere ferredoxina como cofactor, que es reducida y posteriormente regenerada transfiriendo el electrón ganado a un H^+ reduciendo los protones con formación de hidrógeno molecular. La transferencia del electrón desde la ferredoxina al protón es catalizada por la enzima hidrogenasa (Chen & Mortenson, 1974), produciendo dos moles de hidrógeno por cada mol de glucosa metabolizada.

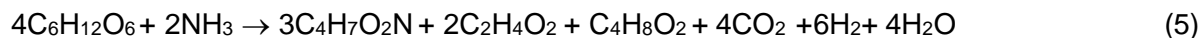
Por otra parte, es posible la producción de dos moles de hidrógeno adicionales a partir del NADH proveniente del glicólisis. En este caso el NADH se oxida transfiriendo sus electrones a la ferredoxina, esta reacción es realizada por la acción de la enzima NADH-ferredoxina-oxidoreductasa. A continuación, la ferredoxina reducida resultante se oxida por la acción de la hidrogenasa reduciendo protones libres y produciendo dos moles de hidrógeno más. Así los equivalentes reductores generados en el metabolismo pueden utilizarse para producir hidrógeno molecular, ecuación (2):



El rendimiento teórico máximo final dependerá de los productos terminales de la fermentación, como el ácido acético y ácido butírico (Sinha & Pandey, 2011). Cuando el Acetyl-CoA es metabolizado completamente para la formación exclusiva de ácido acético, se puede alcanzar un rendimiento de 4 moles de H₂ por mol de glucosa, por el contrario, cuando solo se produce ácido butírico como subproducto el rendimiento disminuye a 2 moles de H₂ por mol de glucosa, ya que 2 moles de NADH son consumidos en la ruta de síntesis de ácido butírico, según se muestra las reacciones en la ecuación (3) y (4):



Integrando las ecuaciones propuestas por (Chen et al., 2006) y considerando la generación de biomasa, el metabolismo de la glucosa y de la síntesis de ácidos orgánicos, se obtiene la siguiente reacción global:



1.2 *Clostridium acetobutylicum*

En la producción de biohidrógeno, es común emplear comunidades microbiológicas que actúan en consorcio, pues se tienen algunas ventajas frente a emplear alguna especie en particular, como la posibilidad de usar residuos industriales como medio de cultivo, sin la necesidad de emplear métodos de esterilización, lo que se traduce en beneficios económicos a lo largo de un proceso de tratamiento de residuos y de generación del biohidrógeno (López, 2022). Las especies de *Clostridium* se utilizan principalmente en métodos de fermentación oscura para la producción de hidrógeno, aprovechando el poder reductor de las hidrogenasas como parte de su mecanismo metabólico (Kim et al., 2023).

Esta bacteria *Clostridium acetobutylicum* es un bastón estrictamente anaeróbico, que ha sido identificado como un potencial productor de biohidrógeno, su cultivo se caracteriza por dos

fases: una fase acidogénica donde se producen ácidos orgánicos e hidrógeno, y una fase solventegénica en la que se producen acetona, butanol y etanol a partir de los ácidos orgánicos (Guerrero et al., 2021). Tiene la capacidad de metabolizar azúcares, almidones y materias ricas en carbohidratos para producir las sustancias antes mencionadas (Molina et al., 1996). Estos microorganismos podrían utilizar una amplia gama de fuentes de carbono, incluida la biomasa lignocelulósica, lo que los convierte en candidatos prometedores para la producción de biohidrógeno (Wang & Yin, 2021).

1.2.1 *Clostridium acetobutylicum* degenerado y silvestre

Cuando bajo ciertas condiciones *C. acetobutylicum*, pierde la capacidad de esporular y de producir solventes como butanol y acetona, debido a la pérdida del plásmido pSOL1, el cual contiene los genes implicados en la solventogénesis y esporulación, ocurre principalmente cuando *C. acetobutylicum* y otros clostridios relacionados son subcultivados varias veces en cultivos discontinuos o se mantienen en cultivos continuos, esto es lo que se denomina como degeneración. En cambio, la cepa silvestre se cultiva a partir de esporas germinadas previamente tratadas con calor para mantener esta característica de esporulación y la solventogénesis (Guerrero et al., 2021; Kashket & Zhi, 1995).

1.2.2 *Cinética de crecimiento microbiano*

La cinética de crecimiento resulta muy útil para evaluar la capacidad de una cepa bacteriana específica para degradar un sustrato, lo que proporciona una indicación indirecta de la asimilación del contaminante por parte del microorganismo, así como otros factores ambientales indispensables dentro del proceso (Gómez et al., 2020). La temperatura adecuada para su de crecimiento está entre 35 y 37 °C por ser una bacteria mesófila. Las esporas necesitan un proceso de activadas mediante choque térmico ya sea por 2 minutos a 100 °C o 10 minutos a 80 °C y crecidas en medio líquido (Janssen et al., 2014).

Durante la fase exponencial de crecimiento, *Clostridium acetobutylicum* y otros clostridios sacarolíticos presentan una capacidad como parte de su metabolismo para transformar variedad de azúcares y almidón en productos como ácidos orgánicos, CO₂ e H₂ (Kashket & Zhi, 1995).

Para evaluar la capacidad de *Clostridium acetobutylicum*, es necesario realizar determinaciones de su crecimiento mediante la absorbancia con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm lo que permite correlacionarla con el peso seco (Flores, 2022).

1.2.3 Ácidos orgánicos

El cultivo de *Clostridium acetobutylicum* se caracteriza por dos fases distintivas: la fase acidogénica y la fase solventogénica (Guerrero et al., 2021). Durante la fase acidogénica, se generan ácidos como acético y butírico, acompañados de producción de hidrógeno y dióxido de carbono, normalmente ocurre durante el crecimiento exponencial. Por otro lado, la fase solventogénica se presenta en la etapa estacionaria del cultivo, en esta fase, los ácidos son reasimilados y utilizados para la producción de butanol, acetona y etanol, durante este proceso el pH del medio se hace constante y la producción de CO₂ aumenta con respecto a la de H₂, así como la producción total de otros gases, debido a la formación de acetona, y la decarboxilación del acetoacetato proveniente del acetoacetil-CoA (Noriega, 2017).

1.3 Fuentes de carbono

Generalmente la principal fuente de carbono proviene de carbohidratos presentes en los sustratos utilizados, como la glucosa, xilosa, almidón y celulosa, sin embargo, también se han empleado hidrolizados de efluentes industriales como suero de queso, lodo anaeróbico de plantas de tratamiento, agua residual de textiles, estiércol, pañales desechables y residuos sanitarios (Feria et al., 2022). El costo del sustrato representa un factor de impacto económico importante, por lo que se han explorado diferentes sustratos como: melazas, maíz, puré de manzana, suero lácteo, hidrolizados, bagazo, etc. Sin embargo, muchos de estos sustratos pueden causar gran debate debido a alimentación humana y esto puede propiciar una crisis

alimentaria, por esto el interés de buscar fuentes de carbono alternas que no tengan un impacto tan importante en la alimentación (Noriega, 2017).

Aunque la glucosa y la fructosa comparten la misma fórmula química ($C_6H_{12}O_6$), difieren en su estructura química debido a la sustitución de un grupo en la posición del carbono 1 en la glucosa y en la posición 2 en la fructosa, además, un átomo de hidrógeno de la glucosa está sustituido por un grupo CH_2OH en la fructosa. Esta diferencia radica en que la glucosa es una aldosa y la fructosa es una cetosa, es decir, el grupo funcional de la glucosa es un aldehído y el de la fructosa es un grupo cetona. Estas simples modificaciones estructurales confieren propiedades distintas desde la absorción hasta el metabolismo, con implicaciones en las funciones celulares de la fructosa (Alcántar et al., 2021).

1.3.1 Fuentes económicas de fructosa

La biomasa ofrece una alternativa prometedora para reemplazar a las materias primas derivadas del petróleo (Leticia et al., 2024). Los residuos o subproductos generados en diversos procesos productivos y usualmente no son de utilidad posterior como materia prima para la cadena de producción (Rosas et al., 2016).

Entre los residuos agroindustriales más utilizados para estos fines son los provenientes de las frutas, el bagazo de agave, un residuo de la producción de tequila, la cachaza, el bagazo, la carbonilla, la paja y el cogollo, residuos de la agroindustria de la caña de azúcar y de la caldera de las fábricas de ingenios azucareros, los desechos cítricos (bagazo y cáscara), la cáscara del plátano, la zoca de café, las pastas proteicas, el suero, el salvado, la vinaza, los residuos de material verde (cáscaras, hojas, tallos, bagazo de frutas), entre otros (Vargas & Pérez, 2018).

Las composición química y biológica de estos residuos varía dependiendo del proceso de transformación y de la materia prima utilizada. Sin embargo, los residuos agroindustriales son materiales lignocelulósicos; es decir, los contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina representan sus mayores porcentajes de composición (Alonso et al., 2011). Los altos costos de disposición de los residuos agroindustriales, hacen que estos se transformen en un problema no

solo ambiental sino económico, el aprovechamiento de este tipo de residuos se convierte en una estrategia ambiental y económicamente adecuada de manejo de subproductos o residuos agroindustriales (Yepes et al., 2008). Parte de estos residuos agroindustriales poseen un potencial energético que puede ser utilizada como biocombustible, siendo ya aprovechados técnicamente en diversas partes del mundo.

En el caso de Ecuador, de acuerdo a la cantidad de energía bruta anual, superficie cultivada y tipo de residuos generados por cada cultivo agrícola se han identificado cuatro tipos de residuos con potencial energético: palma africana, banano, arroz y caña de azúcar, los dos primeros son considerados como cultivos de exportación y los dos últimos de subsistencia. Entre ellos, el cultivo de palma africana es el que produce más cantidad de residuos anuales, seguido del banano, arroz, cacao y caña de azúcar. A pesar de que el cacao posee mayor cantidad de residuos anuales que la caña de azúcar, ésta tiene un poder calorífico inferior: 19,85 y 15,53 MJ/kg respectivamente, por lo que la cantidad de energía bruta producida anualmente es menor que la generada a partir de los residuos del cacao (Calderón et al., 2017).

Tabla 1

Selectividad de los cultivos agrícolas

Cultivo	Poder calorífico inferior (MJ/kg)	Residuos (t/año)	Superficie (ha)	Energía bruta (TJ/año)	Tipo de residuo	Zonas de producción prioritaria
Palma africana	16,40	6 872 469,3	240 333	87 835,5	Procesamiento	Los Ríos, Esmeraldas, Sucumbíos
Banano	12,63	4 926 095,6	221 775	62 231,8	Procesamiento y campo	Los Ríos y El Oro
Cacao	15,53	2 015 352,2	507 721	13 631,5	Procesamiento	Guayas, Los Ríos, Manabí, Esmeraldas
Arroz	13,35	2 106 695,9	411 459	28 357,0	Procesamiento y campo	Guayas y Los Ríos

Caña de azúcar	19,85	793 283,4	106 926	15 746,3	Procesamiento y campo	Guayas
Maíz duro	12,55	434 921,3	361 347	5 423,3	Procesamiento y campo	Los Ríos y Guayas
Café	13,46	104 048,3	113 029	1 004,6	Procesamiento	Manabí, Loja, Sucumbíos, Orellana

Nota. Adaptado de Valoración económica de los cobeneficios del aprovechamiento energético de los residuos agrícolas en el Ecuador. Por Comisión Económica para América Latina y el Caribe (2017).

Los residuos de frutas y verduras representan una fuente importante de carbohidratos principalmente en forma de fructosa, en el caso de las frutas se encuentra entre 1 y 8%, alcanzando una mayor concentración en frutas maduras, por otro lado, las verduras presentan un valor entre 1 y 6% de la concentración (Gomez et al., 2022).

Capítulo dos

Materiales y métodos

2.1 Selección de fructosa como fuente de carbono y energía.

Según la literatura revisada la fructosa se puede obtener de varios desechos que pueden ser transformados y aprovechados para la producción de biohidrógeno (Bedoya et al., 2008) tales como: paja de caña de azúcar, fibra de maíz, bagazo de sorgo dulce (Bailón & Jiménez, 2021), café, cáscara de banano y plátano (Lara & Méndez, 2021).

En Ecuador entre los residuos agrícolas que se pueden aprovechar energéticamente destacan, el cultivo de palma africana, el banano, el arroz, el cacao y la caña de azúcar. La Tabla 2 describe los costos de estos productos y por qué resultan una alternativa económica para su uso en la producción de hidrógeno.

Tabla 2

Análisis de costos y establecimiento de precios para residuos agrícolas en Ecuador

Localización	Tipo de productor	Cultivo	Capital de inversión (dólares)	Precio del residuo (USD/ton)	Precio del residuo (USD/kWh)
Guayas	Grande	Banano	1 210 310,18	0,00	0,00
		Caña	564 160,85	0,00	0,00
Los Ríos		Banano	1 135 295,42	0,00	0,00
		Caña	1 495 824,99	0,00	0,00

Nota. Adaptado de Valoración económica de los cobeneficios del aprovechamiento energético de los residuos agrícolas en el Ecuador. Por Comisión Económica para América Latina y el Caribe (2017).

2.2 Activación y propagación de la cepa de *Clostridium acetobutylicum*

Para inocular *Clostridium acetobutylicum* se preparó el medio RCM (Reinforced Clostridial Medium) modificado con tres concentraciones diferentes de fuente de carbono (fructosa); el primero con una concentración de fructosa de 1 g·L⁻¹, el segundo de 2,5 g·L⁻¹ y el tercero con una concentración de 5 g·L⁻¹, mencionando que este es el único reactivo que varía en la preparación de los medios siguiendo la composición establecida en la Tabla 3. Se tuvo en cuenta que el medio de cultivo contiene otras fuentes de carbono, lo que genera una variación en los

valores finales de carbohidratos. Además, el pH del medio se ajustó a un rango entre 6,8 y 7,0 con un pHmetro HANNA HI 8424.

Tabla 3

Composición del medio de cultivo RCM modificado

Compuesto	Fórmula	Concentración en g·L⁻¹
Extracto de carne		10
Extracto de levadura		3
Cisteína	C ₃ H ₇ NO ₂ S	0.5
Cloruro de sodio	NaCl	5
Acetato de sodio	C ₂ H ₃ NaO ₂	3
Fructosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	1; 2,5; 5
Resazurin	C ₁₂ H ₇ NO ₄	0,005

Nota. Composición del medio RCM en función de las diferentes concentraciones

Los cultivos se llevaron a cabo en frascos de suero de 25 mL, selladas con tapones de caucho butílico y sellos de aluminio. Antes de la inoculación, se crearon condiciones anaerobias en las botellas purgándolas con gas nitrógeno durante 1 minuto y luego se sometieron a esterilización en autoclave a 121°C.

2.2.1 Traspasos sucesivos

Se realizó mediante cultivos sucesivos en lotes, con un volumen de trabajo equivalente 10% V/V, es decir, 1 mL de cultivo crecido de *Clostridium acetobutylicum* durante 24 h y 9 mL de medio de cultivo y se incubaron a 37 °C.

Los traspasos en lotes se realizaron diariamente en la cámara de esterilización, empleando dos tipos de experimentaciones sin choque térmico (cepa degenerada) y con choque térmico (cepa silvestre) a 80 °C durante 5 min para esporular; todos los experimentos se replicaron por triplicado y los resultados se presentaron como promedios. El mismo proceso se aplicó para las tres concentraciones.

2.2.2 Cinética de crecimiento

Se desarrolló en frascos de suero de 50 mL, donde se colocó 3 mL de medio de cultivo crecido de *Clostridium acetobutylicum* durante 24 h y 27 mL de medio de cultivo y se incubaron a 37 °C. Los tratamientos fueron sin choque (cepa degenerada) y con choque térmico (cepa silvestre) por triplicado y duplicado analítico.

2.3 Metodologías analíticas

2.3.1 Determinación de hidrógeno producido

El gas total producido se midió mediante la extracción con jeringa de 60 mL y el volumen neto de hidrógeno se evaluó por cálculo estequiométrico, en base a las moles de H₂ y de CO₂ producidas por las moles de fructosa consumidas.

2.3.2 Determinación de biomasa y azúcar

Se tomó 2 mL de cultivo microbiano crecido con una jeringa estéril para control de biomasa y el azúcar.

La biomasa se determinó mediante el método turbidimétrico analizado en espectrofotómetro UV-Visible Thermoscientific Helios Epsilon a una longitud de onda de 600 nm. La formación de biomasa se determinó interpolando la absorbancia medida en la curva de calibración (Apéndice B).

El contenido de azúcar se determinó mediante la técnica de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). El procedimiento consistió en agregar 100 µL del medio de cultivo crecido con 100 µL del reactivo DNS en tubos de ensayo, homogenizando la muestra con un vortex. Los tubos se colocan en un baño maría precalentado a 92°C durante 5 min permitiendo que ocurra la reacción entre el DNS y los azúcares presentes. Para detener la reacción, los tubos se colocaron en agua fría por 5 min; posteriormente se añadió 1 mL de agua destilada a cada muestra. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible Thermoscientific Helios

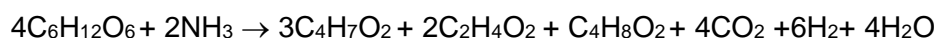
Epsilon a una longitud de onda de 540 nm. Finalmente, los resultados consumo de azúcar en concentraciones $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ se reemplaza en la curva de calibrado del Apéndice A.

2.4 Cinética de crecimiento de *Clostridium acetobutylicum*

La cinética de crecimiento y producción de hidrógeno se determinó en función del tiempo realizando mediciones de volumen de gas, crecimiento celular y consumo de azúcar en un intervalo de tiempo de 3 horas. Las cinéticas de crecimiento se realizaron hasta llegar a la fase estacionaria. Cada ensayo se realizó por triplicado y duplicado analítico.

2.5 Cálculo del rendimiento teórico de producción de biohidrógeno

En base a la reacción estequiométrica se producen 6 moles de hidrógeno a partir del consumo de 4 moles de glucosa (fructosa) como fuente de carbono, presentados a continuación:



Los moles obtenidos se usaron en la ecuación de los gases ideales ($PV = nRT$) que permitieron calcular el volumen total de gas obtenido, es importante tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- R: $0.082 \text{ atm}\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ (constante universal de los gases ideales)
- Presión: 0.7 atm (presión atmosférica en la ciudad de Loja)
- Temperatura: 37°C o 310.15 K (Temperatura en la incubadora)

Finalmente, el rendimiento de hidrógeno se determinó mediante la relación entre los moles de hidrógeno producidos y los moles de fructosa consumidos, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento de } H_2 = \frac{\text{moles de hidrógeno producido}}{\text{moles de fructosa consumida}}$$

2.6 Cálculos para la determinación de la tasa volumétrica de productividad de hidrógeno

La productividad se obtuvo en función de producción experimental de hidrógeno, el volumen de fermentación y el tiempo de fermentación, a partir de la siguiente ecuación.

$$Productividad = \frac{\text{volumen de hidrógeno generado (L)}}{(\text{volumen de fermentación (L)})(\text{tiempo de fermentación (h)})}$$

2.7 Cálculo para determinar la velocidad máxima de crecimiento

Para calcular la velocidad máxima de crecimiento se consideró diferentes picos de biomasa en función de la fase exponencial de la cinética para *Clostridium acetobutylicum*.

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{x * x_m - x_0 * x}{x_0 * x_m - x_0 * x_0}\right)}{t}$$

Donde:

X_0 = Concentración celular inicial

X_m = Concentración celular máxima

X = Concentración celular final

μ_m = Velocidad de crecimiento máxima

t = tiempo

2.8 Cálculo para el rendimiento de biomasa

De acuerdo con la definición de rendimiento global de biomasa a partir de sustrato (Y_{xs}) reportada por (Doran, 2013), el valor de este parámetro se puede calcular entre la diferencia de concentración de biomasa y la diferencia de consumo de sustrato al momento del pico máximo de biomasa:

$$Y_{xs} = \frac{\Delta X}{-\Delta S}$$

ΔX = biomasa producida ($g \cdot L^{-1}$)

ΔS = sustrato consumido ($g \cdot L^{-1}$)

2.9 Análisis estadístico

Las experimentaciones se realizaron por triplicado y duplicado analítico para cada concentración. Para poder comparar los resultados se realizó análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa "R" mediante el paquete R Commander.

En este estudio se asumió como variable independiente cuantitativa a las tres concentraciones y a los tratamientos de sin y con choque térmico (cepa degenerada y cepa silvestre). Las variables dependientes que se evaluaron fueron la producción de gas (mL), concentración de biomasa $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y el consumo de fructosa $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Capítulo tres

Resultados

3.1 Análisis de los resultados

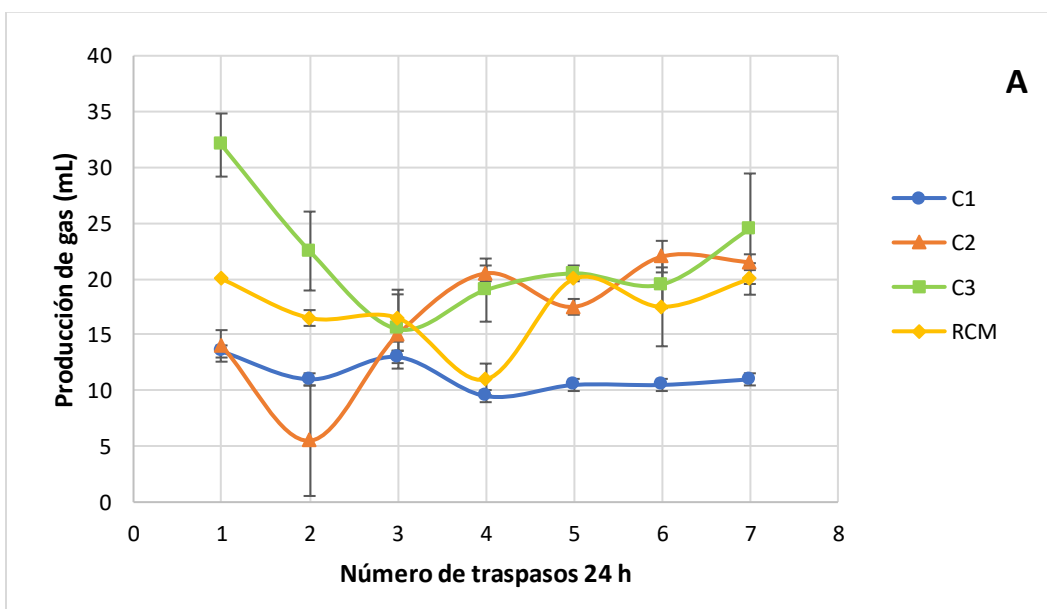
3.1.1 Adaptación de *Clostridium acetobutylicum* en medio RCM a diferentes concentraciones de fructosa.

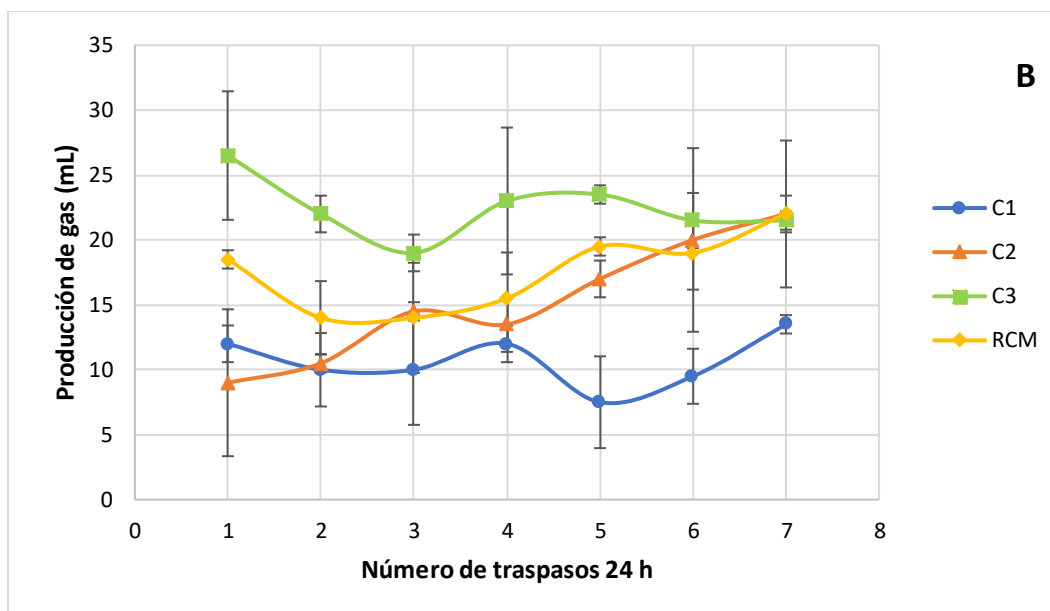
Para lograr adaptar la cepa al medio se realizó una serie de trasposos (7 trasposos) con cada una de las tres concentraciones experimentales de azúcar: C1 (1 g·L⁻¹), C2 (2,5 g·L⁻¹) y C3 (5 g·L⁻¹); este proceso se realizó cada 24 horas por triplicado para la cepa silvestre como para la cepa degenerada. En cada traspaso se monitorearon parámetros como producción de gas (mL), crecimiento celular (g·L⁻¹) y consumo de azúcar (g·L⁻¹).

En base a la producción de gas se pudo observar que todas las experimentaciones comienzan a tomar un valor similar luego del quinto traspaso, en el caso de la experimentación A con la muestra control "RCM" se llega a una producción de gas total en un rango de 11 a 20 mL y para el caso de la muestra B, este presenta una variación de producción de 14 a 22 mL.

Figura 1

Producción de gas de Clostridium acetobutylicum en función del número de trasposos



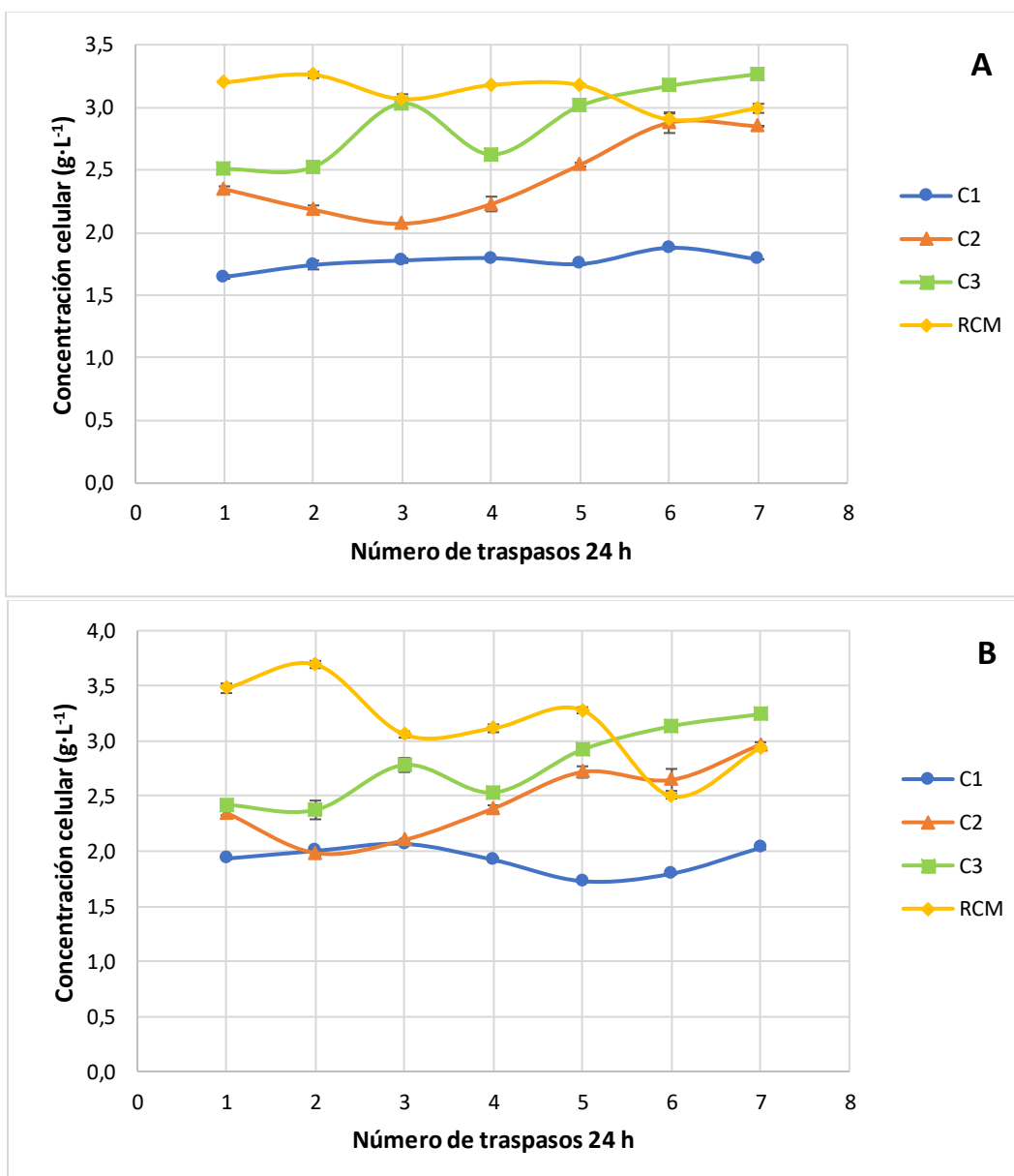


Nota. A) Producción de gas por *Clostridium acetobutylicum* degenerado. B) Producción de gas por *Clostridium acetobutylicum* silvestre. C1 (1 g·L⁻¹), C2 (2,5 g·L⁻¹) y C3 (5 g·L⁻¹). Los datos corresponden a los valores medios ± DE (n=3).

En la Figura 2, para ambas experimentaciones A y B, la muestra control RCM, presentó una mayor concentración celular a diferencia de las tres concentraciones experimentales; se observó que, a una mayor concentración de azúcar existe un incremento en la concentración celular, sin embargo, este valor no superó los 3,5 g·L⁻¹ en ninguna de las tres concentraciones.

Figura 2

Crecimiento celular de *Clostridium acetobutylicum* en función del número de traspasos



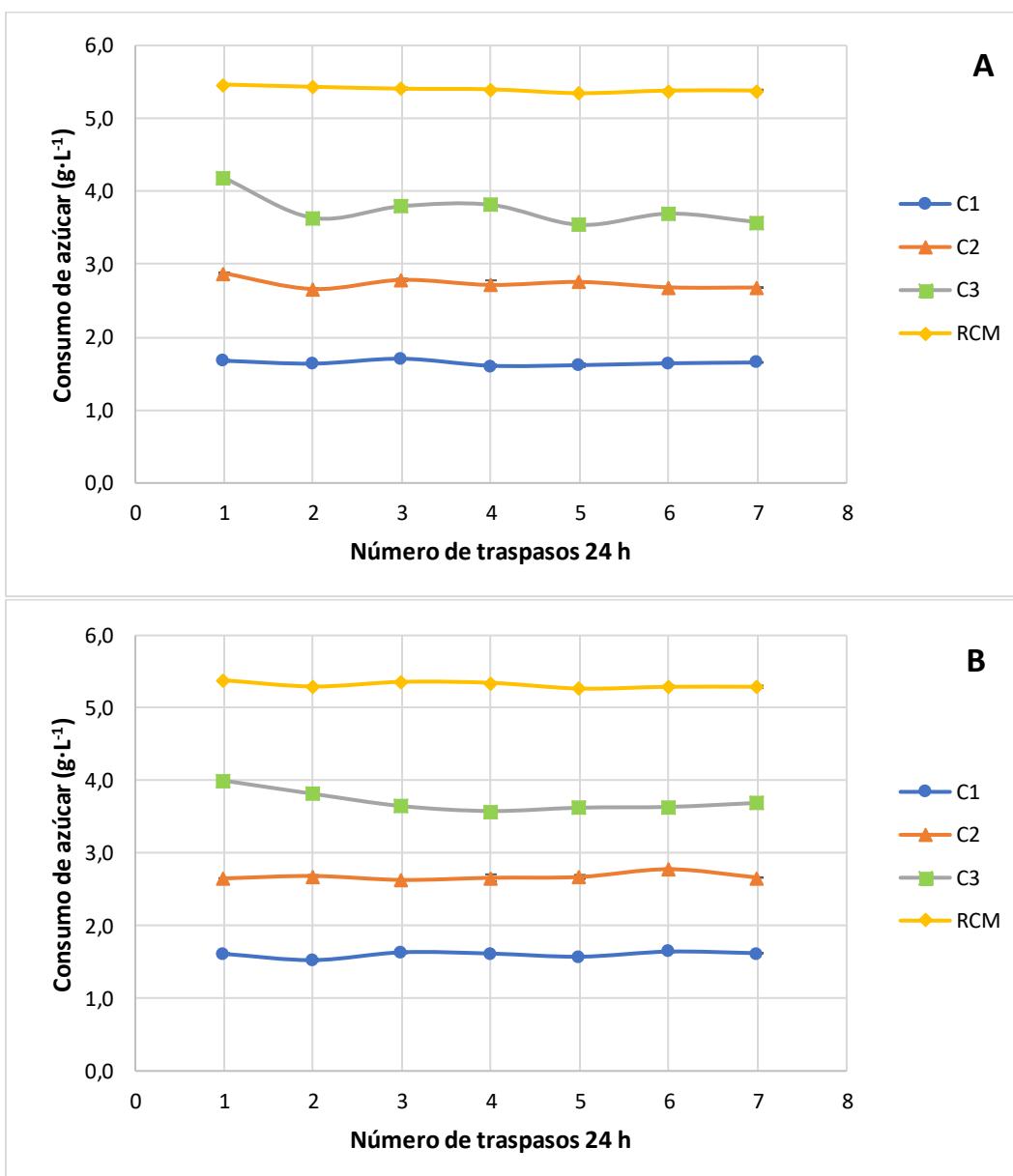
Nota. A) Crecimiento celular por *Clostridium acetobutylicum* degenerado. B) Crecimiento celular por *Clostridium acetobutylicum* silvestre. C1 (1 g·L⁻¹), C2 (2,5 g·L⁻¹) y C3 (5 g·L⁻¹). Los datos corresponden a los valores medios \pm DE (n=6).

En la Figura 3 (A y B), se observó que la bacteria consumió cierta cantidad de azúcar en cada traspaso, dejando siempre un residuo independientemente de la concentración aplicada; el medio RCM y la tercera concentración poseen 5 g·L⁻¹ de azúcar (glucosa y fructosa,

respectivamente), a pesar de ello, el consumo difirió en ambos casos, debido a que en varias investigaciones *Clostridium acetobutylicum*, utiliza glucosa como fuente de carbono (Azman et al., 2016; Guerrero et al., 2021; Kim et al., 2023), más no fructosa y este estudio está probando esta alternativa.

Figura 3

Concentración de azúcar de Clostridium acetobutylicum en función del número de trasposos



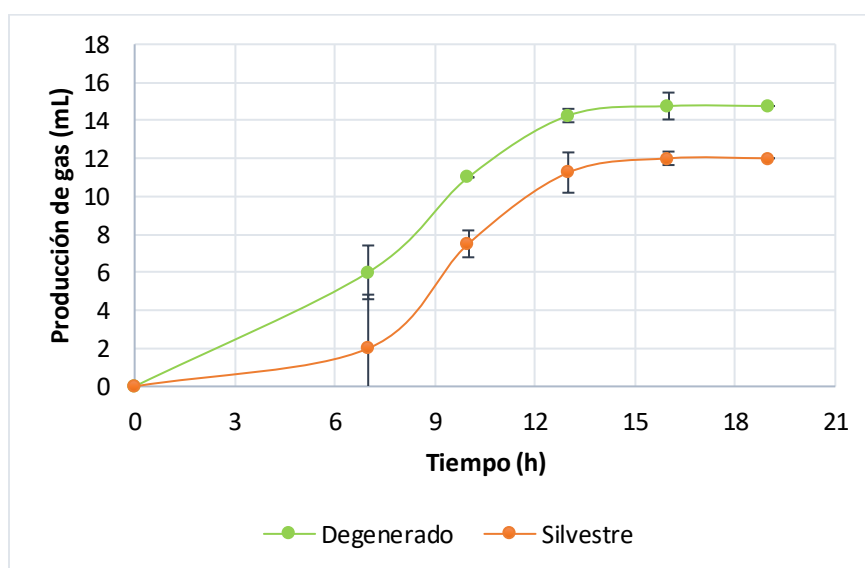
Nota. A) Variación del consumo de azúcar por *Clostridium acetobutylicum* degenerado. B) Variación del consumo de azúcar por *Clostridium acetobutylicum* silvestre. C1 (1 g·L⁻¹), C2 (2,5 g·L⁻¹) y C3 (5 g·L⁻¹). Los datos corresponden a los valores medios ± DE (n=6).

3.1.2 Cinética de crecimiento de *Clostridium acetobutylicum* en medio RCM (Reinforced clostridial medium) variando las concentraciones de fructosa

Para la concentración 1 (1 g·L⁻¹), la primera medición se realizó a las 10 h de haber inoculado el cultivo, para la segunda (2,5 g·L⁻¹) y tercera (5 g·L⁻¹) concentración, la primera medición se realizó a las 12 h de inoculación; la variación en los tiempos de análisis dependió de la concentración de azúcar y la fase de latencia de la bacteria. La cinética de crecimiento para la primera concentración se estableció en un tiempo de 19 horas, la segunda concentración en un tiempo de 30 horas y la tercera concentración en un tiempo de 33 horas.

Figura 4

Producción de gas de Clostridium acetobutylicum con 1 g·L⁻¹ de fructosa



Nota. Producción de gas total en la cinética de crecimiento en un tiempo de 19

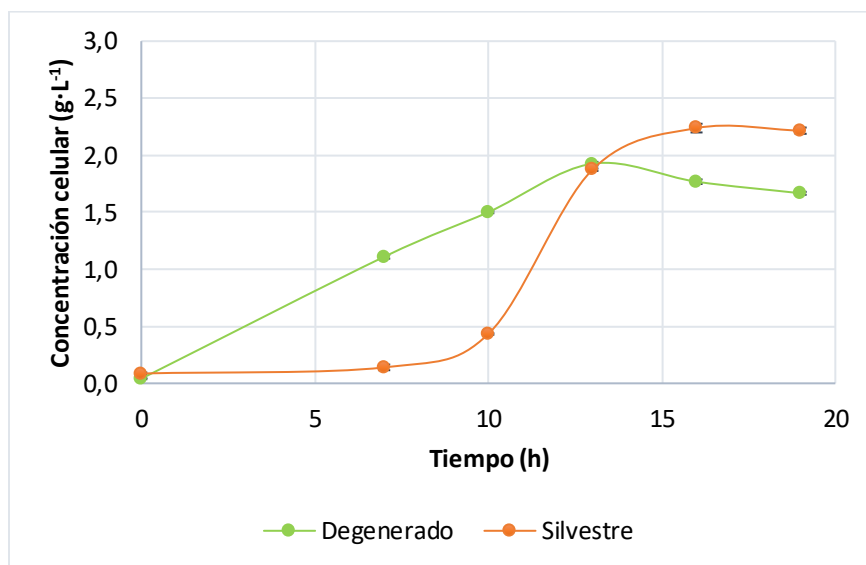
h. Los datos corresponden a los valores medios ± DE (n=3).

En la Figura 4, se observó que la cepa degenerada logró obtener una producción máxima de 14,75 ± 1,768 mL y en el caso de la cepa silvestre se alcanzó una producción máxima de 12

$\pm 0,707$ mL, la cinética término su producción a las 19 horas en ambos casos, lo que reflejó que está empezando la fase de muerte celular.

Figura 5

Concentración celular de Clostridium acetobutylicum con 1 g·L⁻¹ de fructosa

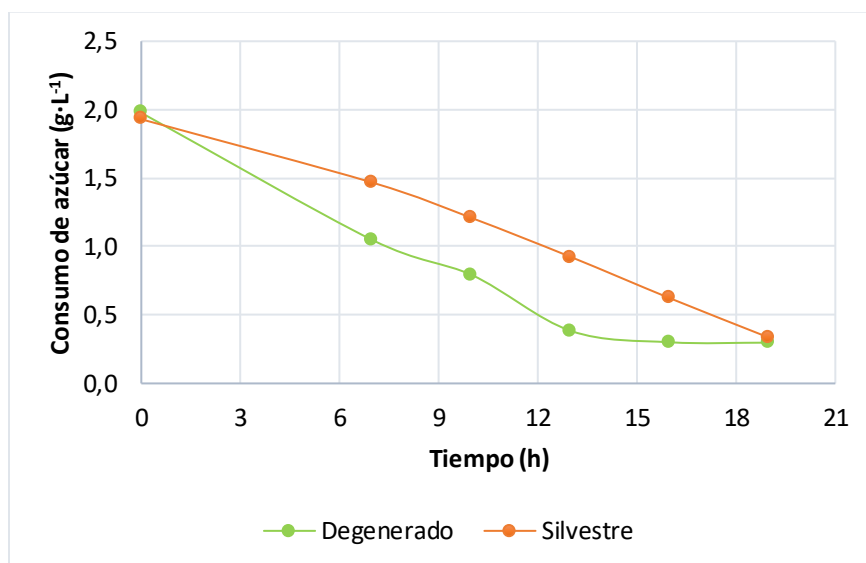


Nota. Crecimiento celular en la cinética de crecimiento en un tiempo de 19 h. Los datos corresponden a los valores medios \pm DE (6).

En la Figura 5, referente a la concentración celular se observó que la cepa degenerada y la cepa silvestre llegó a una biomasa de $1,926 \pm 0,016$ g·L⁻¹ y $2,238 \pm 0,038$ g·L⁻¹ respectivamente en un lapso de 13 y 16 horas, y desde ahí el microorganismo entró a una fase de muerte celular, en el caso de la cepa degenerada tuvo una relación con la producción de gas ya que hasta eso momento es el último punto de producción.

Figura 6

Consumo de azúcar de *Clostridium acetobutylicum* con $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fructosa

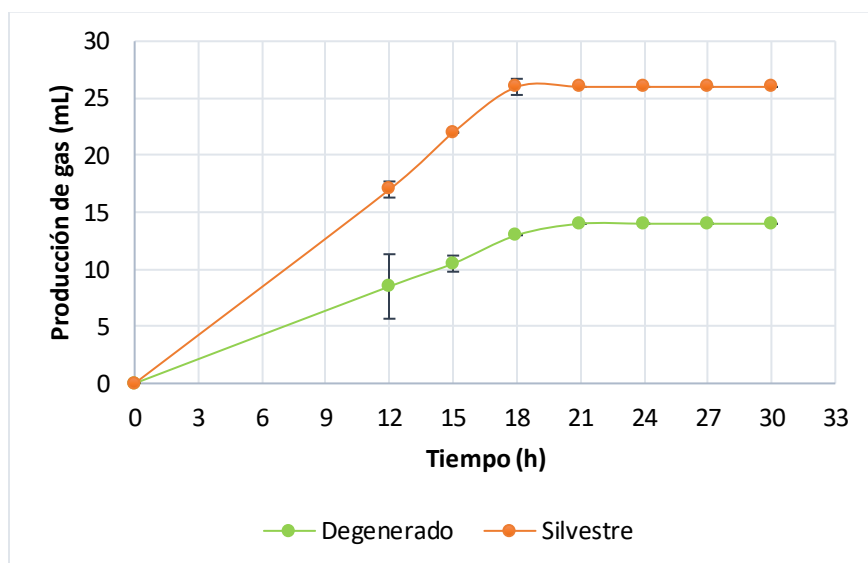


Nota. Consumo de azúcar en la cinética de crecimiento en un tiempo de 19 h. Los datos corresponden a los valores medios \pm DE (n=6).

En la Figura 6 se analizó el consumo de azúcar, para el caso de *Clostridium acetobutylicum* degenerado a las 19 h se consumió $1,679 \pm 0,003 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y en el caso de *Clostridium acetobutylicum* silvestre se tuvo un consumo de $1,596 \pm 0,012 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, aunque la cantidad de azúcar inicial fue baja, la bacteria no logró consumirla por completo. A las 13 h se consumió en ambos casos $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, el cual pudo ser de la concentración de fructosa agregada, sin embargo, se debe hacer un análisis para determinar si no es otra fuente de carbono.

Figura 7

Producción de gas de *Clostridium acetobutylicum* con $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fructosa



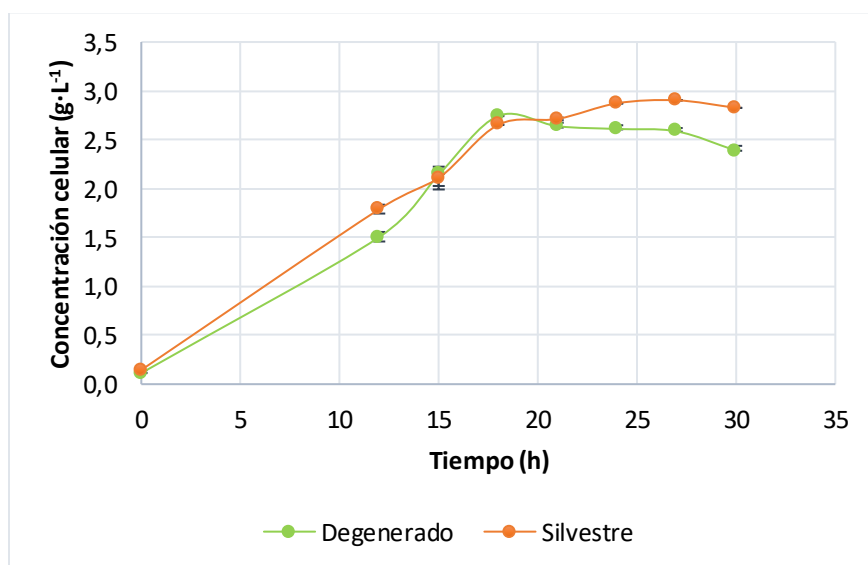
Nota. Producción de gas total en la cinética de crecimiento en un tiempo de 30

h. Los datos corresponden a los valores medios \pm DE (n=3).

En la Figura 7, se observó que en la cepa degenerada hubo una producción máxima de $14 \pm 1,414 \text{ mL}$ y para el caso de la cepa silvestre este alcanzó una producción máxima de $26 \pm 2,121 \text{ mL}$, y este terminó su producción a las 21 y 18 horas respectivamente.

Figura 8

Concentración celular de *Clostridium acetobutylicum* con $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fructosa

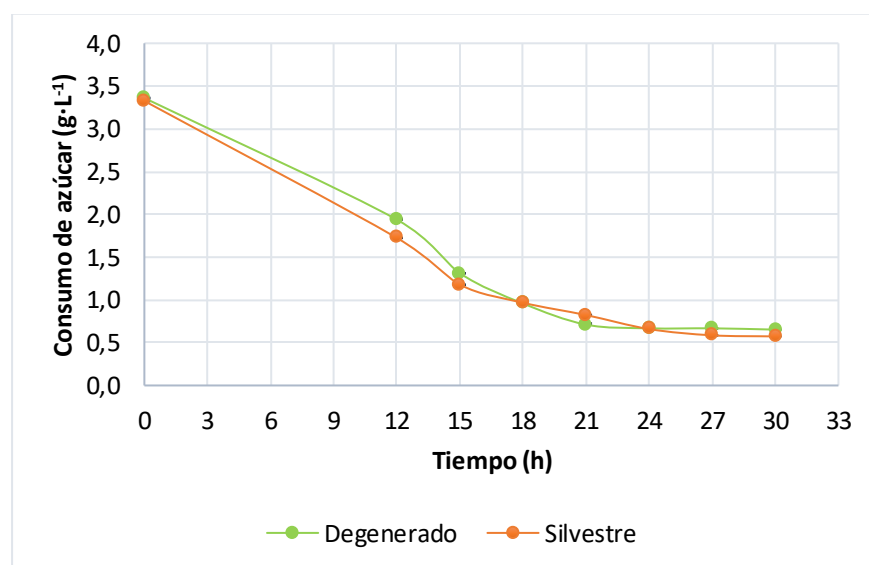


Nota. Crecimiento celular en la cinética de crecimiento en un tiempo de 30 h. Los datos corresponden a los valores medios \pm DE (n=6).

En la Figura 8, referente a la concentración celular se observó que la cepa degenerada y la cepa silvestre, llegó a una biomasa de $2,744 \pm 0,004 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $2,903 \pm 0,003 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a las 18 y 27 horas respectivamente y hasta ahí el microorganismo terminó su fase exponencial.

Figura 9

Consumo de azúcar de Clostridium acetobutylicum con $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fructosa

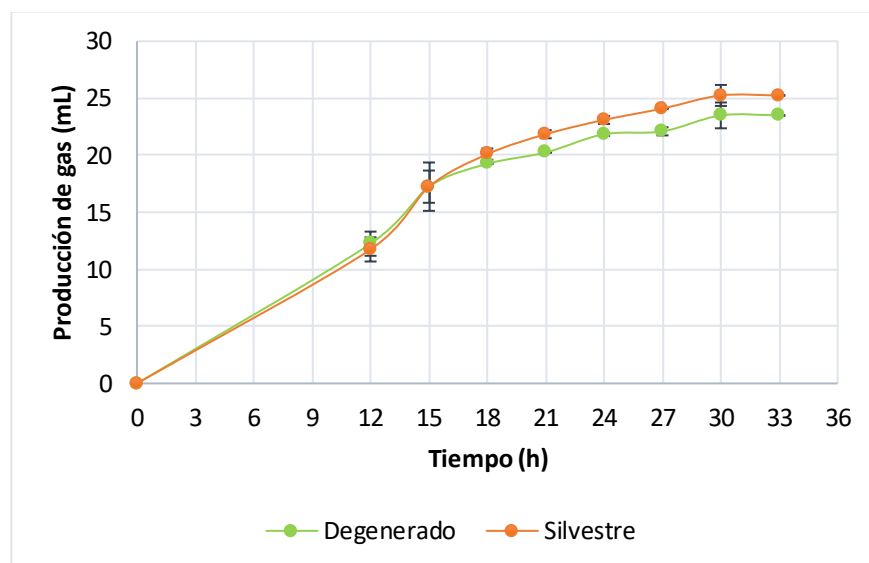


Nota. Consumo de azúcar en la cinética de crecimiento en un tiempo de 33 h. Los datos corresponden a los valores medios \pm DE (n=6).

En la Figura 9 se analiza el consumo de azúcar, para el caso de la cepa degenerada a las 30 h se consumió $2,707 \pm 0,003 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y en el caso de la cepa silvestre se tuvo un consumo de $2,752 \pm 0,003 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, la bacteria no logró consumir por completo el azúcar. A las 21 h se consumió en ambos casos $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, el cual pudo ser de la concentración de fructosa agregada, sin embargo, es necesario realizar un análisis para determinar si no es otra fuente de carbono.

Figura 10

Producción de gas de *Clostridium acetobutylicum* con $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fructosa



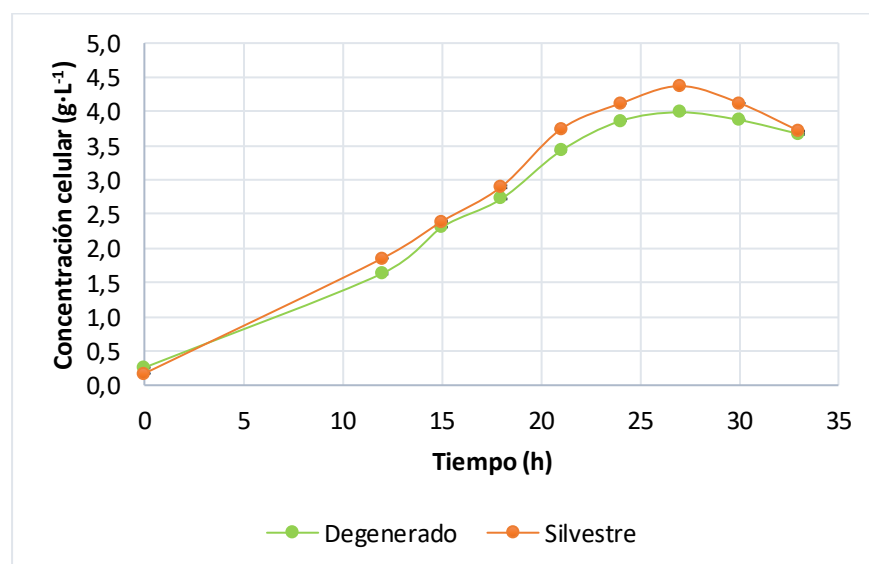
Nota. Producción de gas total en la cinética de crecimiento en un tiempo de 33

h. Los datos corresponden a los valores medios \pm DE (n=3).

En la Figura 10, se observó que en la cepa degenerada hubo una producción máxima de $23,5 \pm 1,697 \text{ mL}$ y para el caso de la cepa silvestre este alcanzó una producción máxima de $25,25 \pm 0,354 \text{ mL}$, y esta terminó su producción a las 30 horas en ambos casos.

Figura 11

Concentración celular de *Clostridium acetobutylicum* con $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fructosa

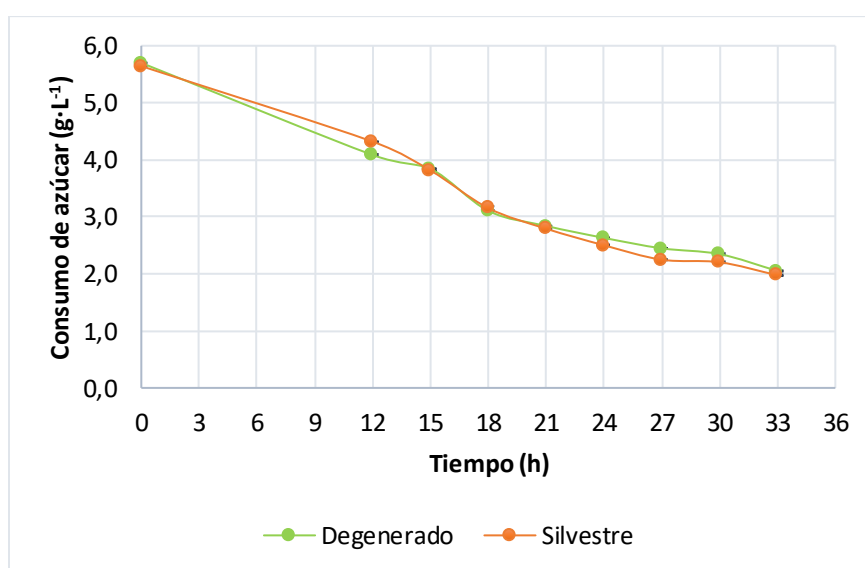


Nota. Crecimiento celular en la cinética de crecimiento en un tiempo de 33 h. Los datos corresponden a los valores medios \pm DE (n=6).

En la Figura 11, referente a la concentración celular el análisis para la cepa degenerada y para la cepa silvestre indicó una biomasa de $3,988 \pm 0,003 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $4,372 \pm 0,001 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente, en ambos casos a las 27 horas, valores superiores a las concentraciones antes evaluadas.

Figura 12

Consumo de azúcar de Clostridium acetobutylicum con $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fructosa



Nota. Consumo de azúcar en la cinética de crecimiento en un tiempo de 33 h. Los datos corresponden a los valores medios \pm DE (n=6).

En la Figura 12 se analizó el consumo de azúcar, para el caso de la cepa degenerada a las 33 h se consumió $3,649 \pm 0,011 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y en el caso de la cepa silvestre se tuvo un consumo de $3,668 \pm 0,013 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, es así que la bacteria logró consumir el 65% del azúcar, dejando un residuo.

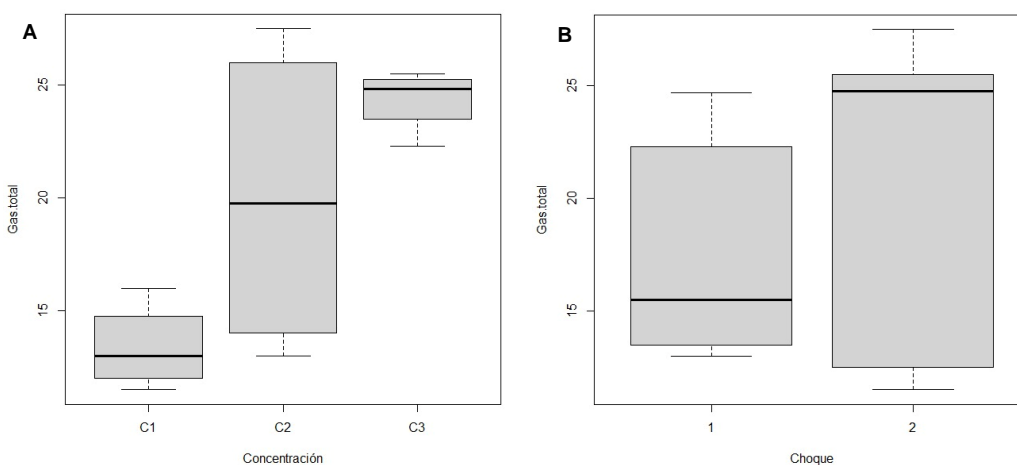
3.1.3 Análisis estadístico de producción de gas, concentración celular y consumo de azúcar en la cinética de crecimiento

En la Figura 13, en el diagrama A se evidenció que, aunque la C2 solapa la C1 y C3, las medias tienen una altamente significativa en la producción de gas. En el diagrama B en base a

la aplicación de la cepa degenerada y la cepa silvestre, se observó algo similar que las concentraciones ya que las cajas se solapan, pero la media no, teniendo una variación leve entre las cepas de *Clostridium acetobutylicum* empleadas.

Figura 13

Diagrama de cajas para producción de gas en función de las variables de concentración y la cepa empleada

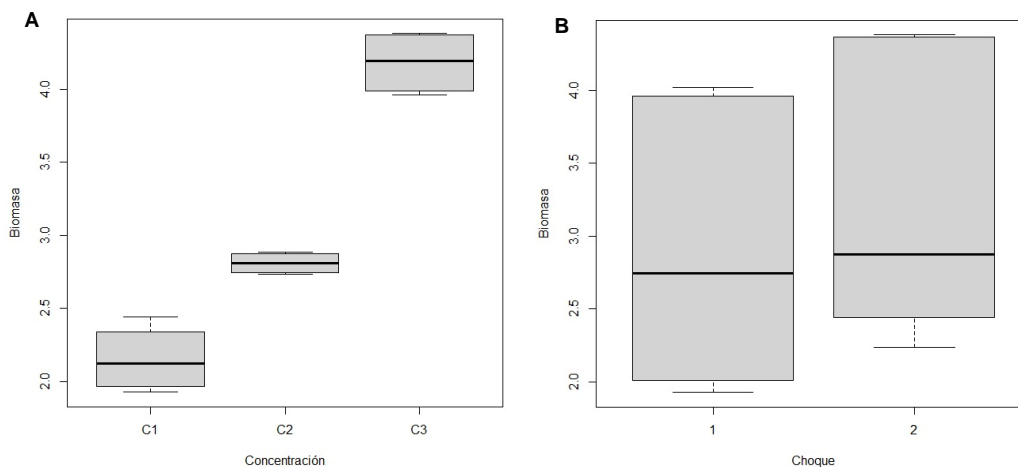


Nota. A) Representa la media para las distintas concentraciones en relación entre el gas producido (mL), para las distintas concentraciones independientemente de la cepa utilizada en la cinética de crecimiento B) Representa la media para las distintas concentraciones en relación entre el gas producido (mL) con la cepa degenerada (1) y la cepa silvestre (2) independientemente de las concentraciones en la cinética de crecimiento. C1 (1 g·L⁻¹), C2 (2,5 g·L⁻¹) y C3 (5 g·L⁻¹).

En la Figura 14, en base a la concentración de biomasa, en el diagrama A se visualizó que las concentraciones afectan significativamente en la biomasa, aunque la primera y segunda concentración están cercanas no se solapan. En el diagrama B se presentó una significancia baja, inclusive las medias están cercanas.

Figura 14

Diagrama de cajas para concentración de biomasa en función de las variables de concentración y la cepa empleada

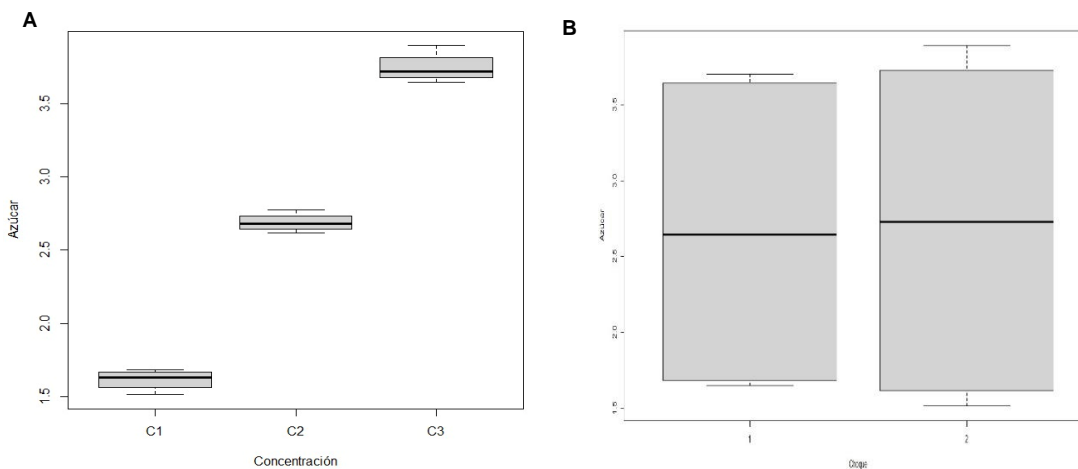


Nota. A) Representa la media para las distintas concentraciones en relación entre la concentración de biomasa (g·L⁻¹), para las distintas concentraciones independientemente de la cepa utilizada en la cinética de crecimiento. B) Representa la media para las distintas concentraciones en relación entre la concentración de biomasa (g·L⁻¹) con la cepa degenerada (1) y la cepa silvestre (2) independientemente de las concentraciones en la cinética de crecimiento. C1 (1 g·L⁻¹), C2 (2,5 g·L⁻¹) y C3 (5 g·L⁻¹).

Para el caso de la Figura 15, se evidenció que la concentración de azúcar afectó en gran medida al consumo de este por *C. acetobutylicum* visualizado en el diagrama A. El utilizar la cepa degenerada o silvestre no afecta en el consumo de azúcar por lo que no existe significancia alguna entre los datos ya que los mismos se solapan y están cerca de la media.

Figura 15

Diagrama de cajas para concentración de azúcar en función de las variables de concentración y la cepa empleada



Nota. A) Representa la media para las distintas concentraciones en relación entre el consumo de azúcar ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), para las distintas concentraciones independientemente de la cepa utilizada en la cinética de crecimiento. B) Representa la media para las distintas concentraciones en relación entre la concentración de azúcar ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) con la cepa degenerada (1) y la cepa silvestre (2) independientemente de las concentraciones en la cinética de crecimiento. C1 ($1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), C2 ($2,5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y C3 ($5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

3.1.4 Velocidad máxima de crecimiento *Clostridium acetobutylicum* variando la concentración de azúcar

Las velocidades máximas de crecimiento se calcularon para las distintas concentraciones, datos que se encuentran en la Tabla 4, donde se logró identificar la mayor velocidad de crecimiento en la primera concentración de $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para la cepa silvestre, con un valor de $0,411\text{ h}^{-1}$ seguida de $0,299\text{ h}^{-1}$ en la cepa degenerada de la misma concentración, lo que permitió identificar que esta concentración experimenta una mayor velocidad considerando que el periodo de fase exponencial de *Clostridium acetobutylicum* duró un tiempo de 19 horas. En la tercera concentración se observó un crecimiento celular más elevado en un lapso de 33 h, sin

embrago, la velocidad de crecimiento disminuyó, es decir, que a mayor concentración de sustrato (fructosa), el tiempo de crecimiento aumenta junto con la biomasa, pero la velocidad disminuye.

Tabla 4

Velocidad máxima de crecimiento en diferentes concentraciones

Concentraciones	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Datos	Valor	$\mu_{\max} \text{ h}^{-1}$
1 g·L ⁻¹	Degenerado	X0	0,041	0,299
		Xm	1,926	
		X	1,666	
		t	19	
	Silvestre	X0	0,086	0,411
		Xm	2,238	
		X	2,215	
		t	19	
2,5 g·L ⁻¹	Degenerado	X0	0,113	0,168
		Xm	2,744	
		X	2,388	
		t	30	
	Silvestre	X0	0,145	0,218
		Xm	2,873	
		X	2,826	
		t	30	
5 g·L ⁻¹	Degenerado	X0	0,258	0,155
		Xm	3,988	
		X	3,673	
		t	33	
	Silvestre	X0	0,172	0,150
		Xm	4,372	
		X	3,718	
		t	33	

Nota. Determinación de la velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}) en base a los datos de biomas obtenidos en la cinética de crecimiento. X₀= Concentración celular inicial, X_m= Concentración celular máxima, X= Concentración celular final, t= tiempo. Los datos corresponden a los valores medios \pm DE (6).

3.1.5 Rendimiento de biomasa de *Clostridium acetobutylicum* variando la concentración de azúcar.

En la Tabla 5, se evidenció que la conversión de fructosa en biomasa varió ligeramente entre las diferentes experimentaciones. Con $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, se evidencio un valor de $1,183 \text{ g biomasa/g fructosa}$ y $1,645 \text{ g biomasa/g fructosa}$, para la cepa degenerada y silvestre respectivamente, dejando un menor residuo de fructosa con relación a las otras concentraciones.

En $2,5$ y $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, aunque la concentración de biomasa final aumentó en un mayor tiempo de crecimiento, el rendimiento de biomasa disminuyó, quizá por la saturación del sustrato ya que se evidenció que se deja mayores cantidades de residuos de sustrato.

Tabla 5

Rendimiento global de biomasa a partir de sustrato consumido

Concentraciones	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Datos	Valor	Y_{xs}
$1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	Degenerado	X_o	0,041	1,183
		X_f	1,926	
		S_o	1,977	
		S_f	0,383	
	Silvestre	X_o	0,086	1,645
		X_f	2,238	
		S_o	1,930	
		S_f	0,622	
$2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	Degenerado	X_o	0,113	1,095
		X_f	2,744	
		S_o	3,360	
		S_f	0,959	
	Silvestre	X_o	0,145	1,007
		X_f	2,873	
		S_o	3,326	
		S_f	0,659	
$5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	Degenerado	X_o	0,258	1,147
		X_f	3,988	
		S_o	5,700	

	S_f	2,447	
	X_o	0,172	
Silvestre	X_f	4,372	1,237
	S_o	5,643	
	S_f	2,248	

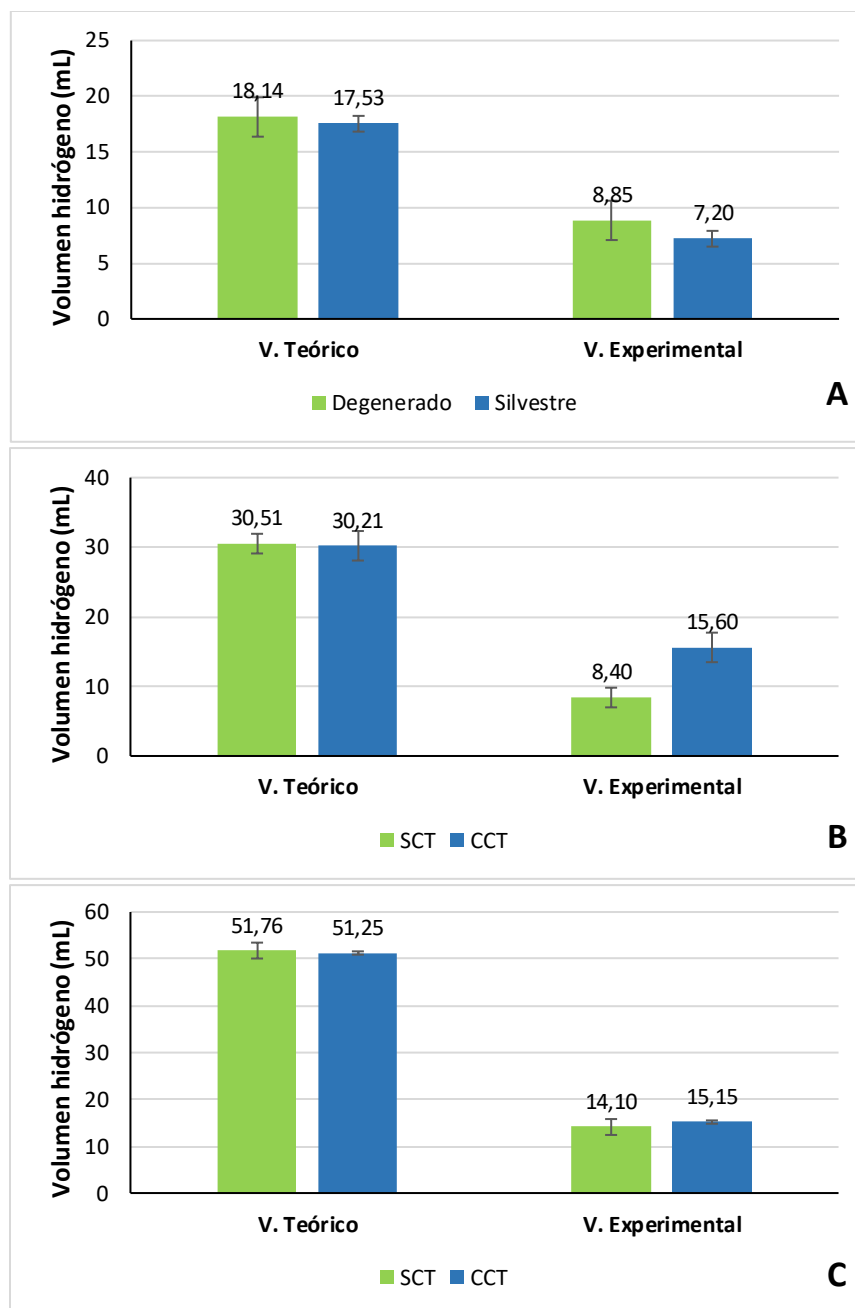
Nota. X_o= Biomasa inicial (g·L⁻¹). X_f= Biomasa final (g·L⁻¹). S_o= Sustrato inicial (g·L⁻¹). S_f= Sustrato final (g·L⁻¹). Los datos corresponden a los valores medios ± DE (6).

3.1.6 Volumen de hidrógeno teórico y práctico obtenido en la cinética de *Clostridium acetobutylicum* variando la concentración de azúcar

La producción de hidrógeno en la primera concentración para la cepa degenerada fue de 8,85 mL y para cepa silvestre fue de 7,20 mL del gas total, con relación al volumen teórico este es inferior al 50 %. Para la segunda concentración en la cepa degenerada fue de 8,40 mL y en la cepa silvestre de 15,60 mL, es decir, solo se produjo el 28 y 50 % del volumen teórico respectivamente. La tercera concentración logró un volumen experimental en la cepa degenerada de 14,10 (21 %) y en la cepa silvestre de 15,15 (29 %) a comparación del volumen teórico. La producción experimental de hidrógeno es menor que el rendimiento teórico ya que parte del sustrato se utiliza para la producción de biomasa y la degradación de los sustratos podría seguir otras rutas bioquímicas sin producción de hidrógeno (Hallenbeck & Benemann, 2002).

Figura 16

Volumen de hidrógeno teórico y práctico de *Clostridium acetobutylicum* con $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fructosa



Nota. Volumen de hidrógeno teórico y experimental para los dos tipos de cepas de *Clostridium acetobutylicum* en función del azúcar consumido. A) Concentración 1 ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). B) Concentración 2 ($2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). C) Concentración 3 ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Los datos corresponden a los valores medios \pm DE (n=3).

3.1.7 Tasa de producción de hidrógeno

Se evidenció que la tasa de producción de hidrógeno refleja valores muy cercanos entre sí, es así que *Clostridium acetobutylicum* degenerado reflejó el valor más bajo de $9,33 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y en el caso de *Clostridium acetobutylicum* silvestre reflejó el valor más alto de $1,73 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ambos con la concentración de $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Tabla 6

Productividad de hidrógeno en las distintas concentraciones

Concentraciones	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Horas (h)	Volumen (L)	H ₂ (L)	Productividad (L·L ⁻¹ h ⁻¹)
1 g·L ⁻¹	Degenerado	19	0,03	$8,85 \cdot 10^{-3}$	$1,55 \cdot 10^{-2}$
	Silvestre	19	0,03	$7,20 \cdot 10^{-3}$	$1,26 \cdot 10^{-2}$
2,5 g·L ⁻¹	Degenerado	30	0,03	$8,40 \cdot 10^{-3}$	$9,33 \cdot 10^{-3}$
	Silvestre	30	0,03	$1,56 \cdot 10^{-2}$	$1,73 \cdot 10^{-2}$
5 g·L ⁻¹	Degenerado	33	0,03	$1,41 \cdot 10^{-2}$	$1,42 \cdot 10^{-2}$
	Silvestre	33	0,03	$1,52 \cdot 10^{-2}$	$1,53 \cdot 10^{-2}$

Nota. Productividad de hidrógeno en función del volumen experimental de H₂.

3.1.8 Rendimiento práctico de hidrógeno usando fructosa como fuente de carbono

La cantidad de moles de fructosa consumida es mayor que la cantidad de moles de hidrógeno producidos, lo que determinó que el rendimiento experimental de hidrógeno varíe. En la Tabla 7 se muestra el cálculo del rendimiento de hidrógeno obtenido en función de la variación de la concentración de fructosa. En la concentración C1 ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) se obtienen rendimientos altos de H₂, 0,870 en la cepa degenerada y 0,745 en la cepa silvestre, en la concentración 2 ($2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) existe un comportamiento diferenciado para la cepa degenerada ya que el rendimiento fue de 0,512 a diferencia de la cepa silvestre, que alcanzó un elevado rendimiento de 0,936, finalmente la concentración 3 ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), mostró un bajo rendimiento de 0,638 en la cepa degenerada y 0,682 en la cepa silvestre.

Tabla 7

Moles de azúcar y de hidrógeno junto con el rendimiento de producción obtenidos en cada una de las concentraciones

Concentraciones	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Moles de fructosa	Moles de H ₂	Rendimiento experimental de producción expresado en moles de H ₂ por mol de azúcar
1 g·L ⁻¹	Degenerado	2,797·10 ⁻⁴	2,43·10 ⁻⁴	0,870
	Silvestre	2,658·10 ⁻⁴	1,98·10 ⁻⁴	0,745
2,5 g·L ⁻¹	Degenerado	4,508·10 ⁻⁴	2,31·10 ⁻⁴	0,512
	Silvestre	4,583·10 ⁻⁴	4,29·10 ⁻⁴	0,936
5 g·L ⁻¹	Degenerado	6,076·10 ⁻⁴	3,88·10 ⁻⁴	0,638
	Silvestre	6,108·10 ⁻⁴	4,17·10 ⁻⁴	0,682

Nota. Rendimiento experimental obtenido en función de los valores medios en función de los moles de fructosa consumidos y los moles de H₂ generados.

3.2 Discusión de los resultados

En este estudio se utilizó fructosa como fuente de carbono debido a que la mayoría de las investigaciones emplean cultivos puros de bacterias en sistemas discontinuos usando azúcares de seis carbonos, como la glucosa. En estas condiciones la materia prima renovable provenientes de residuos orgánicos representan una alternativa de azúcar más deseable (Baeyens et al., 2020). Existen diferentes residuos que contienen lignocelulosa, sin embargo, cabe destacar que cuanto mayor es el contenido de lignina en la biomasa, más difícil es la conversión directa a biohidrógeno, es así que el bagazo de caña de azúcar, con un contenido de lignina del 8,3 %, produjo 7019 mL H₂·L⁻¹ que presentó solo 8,3% de lignina (Soares et al., 2020).

Referente a la producción de hidrógeno por *Clostridium acetobutylicum* utilizando 25 g·L⁻¹ de azúcar obtenido de racimos vacíos de palma aceitera (OPEFB) pretratados, se pudo observar que la producción acumulada de gas total fue de 100 mL a las 25 horas (Ibrahim et al.,

2015), comparativamente empleando fructosa como sustrato, se alcanzaron producciones entre 12 y 26 mL en un rango de 13 a 27 horas lo que sugiere una relación entre las horas de fermentación y la cantidad de azúcar del medio.

Por otro lado, la producción de hidrógeno por *C. acetobutylicum* YM1, aplicando una temperatura de incubación de 38 °C, un valor de pH de cultivo inicial de 6,5 y una cantidad de inóculo de 20% en 200 mL de medio de cultivo; con una concentración inicial de 32,85 g·L⁻¹ de azúcar hidrolizado (glucosa – xilosa), de los cuales se consumieron 32,5 g·L⁻¹, fue de 533,8 mL (Azman et al., 2016). Con *Clostridium acetobutylicum* en un volumen de 30 mL con una concentración inicial de 3,326 g·L⁻¹ de fructosa, se obtuvieron 15,6 mL de hidrógeno, consumiéndose 2,752 g·L⁻¹ de azúcar. En base a ello, la glucosa ha demostrado ser el sustrato preferido por la mayoría de las bacterias productoras de hidrógeno en comparación con otros azúcares fermentables (Wu et al., 2014).

Según un estudio realizado por Guerrero et al., (2021), usando *Clostridium acetobutylicum* y una concentración de glucosa de 60 g·L⁻¹ se pudo observar que la concentración celular alcanzó una concentración máxima con la cepa degenerada de 2,61 g·L⁻¹ en 32 h con un consumo de azúcar del 54,73% y con la cepa silvestre 3,82 g·L⁻¹ en 40 h con un consumo de azúcar del 47,20% dando como resultado un rendimiento de ($Y_{x/s}$) de 0,11 g biomasa ·g glucosa⁻¹ y en este estudio se pudo observar que con la concentración de fructosa de 2,5 g·L⁻¹ en la cepa degenerada llegó a 2,734 g·L⁻¹ y en la cepa silvestre llegó a 2,903 g·L⁻¹ en 18 y 24 h respectivamente, para el caso de la concentración de 5 g·L⁻¹ de fructosa las concentraciones celulares aumentaron a 3,988 g·L⁻¹ en la cepa degenerada con un consumo de azúcar del 35,98% y 4,372 g·L⁻¹ en la cepa silvestre con un consumo de azúcar del 35% a las 27 h y rendimiento de ($Y_{x/s}$) de superior a 1 g biomasa·g fructosa⁻¹ en todos los experimentos, en base a estos datos indicando que, aunque la concentración de fructosa se usó en concentraciones menores y hubo menor consumo que la glucosa, logró generar mayor concentración de biomasa en menos tiempo.

De acuerdo con Kutzenok & Aschner (1952), las células degeneradas crecen más que las no degeneradas, pero no más rápido, esto debido a la división celular continua de las células degeneradas, caso que no sucede en las no degeneradas, en este estudio los resultados evidenciaron que no es así, ya que la cepa silvestre presenta un mayor crecimiento en comparación con la degenerada en las tres concentraciones analizadas, esto indica que aunque la degeneración parezca la más apropiada para los cultivos de *C. acetobutylicum* propagados vegetativamente las condiciones experimentales podrían haber afectar de manera negativa para que no se produzca la degeneración o se reinvirtiera el proceso, favoreciendo de esta manera al crecimiento de las células no degeneradas (Kashket & Zhi, 1995).

Según un estudio presentado por Son et al. (2021), usando una cepa silvestre *Clostridium acetobutylicum* se logró una producción de hidrógeno de 67 mL, considerando un cultivo de 100 y un rendimiento de $1,07 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol} \cdot \text{glucosa}^{-1} \text{ mL}$ de medio RCM durante 48 h, en base a este estudio con la cepa silvestre se obtuvo valores de 7,20, 15,60 y 15,15 mL respectivamente para cada una de las concentraciones considerando que se trabajó con 30 mL de medio de cultivo y en un tiempo de 19, 30 y 33 horas, lo que indica que la producción puede variar en función al volumen de trabajo.

En relación a la tasa de producción de hidrógeno obtenida en este estudio en un rango de $9,33 \cdot 10^{-3}$ a $1,73 \cdot 10^{-2} \text{ L} \cdot \text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ independientemente de la concentración y el tratamiento, evidencia un rendimiento considerablemente inferior a los de otras investigaciones, Zhang et al. (2006) menciona una tasa de producción de 0,089 a $0,22 \text{ L} \cdot \text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ cuando las concentraciones de glucosa variaron de 1,0 a $10,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, en el estudio de Guerrero et al. (2021) llega a $0,25 \text{ L} \cdot \text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, mientras que el reportado por Liu et al. (2019) de $0,403 \text{ L} \cdot \text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ es relativamente alto.

En base al rendimiento, en otros estudios aplicando diferentes sustratos se obtienen rendimientos de $1,02 \text{ mol H}_2 \text{ mol hexosa}^{-1}$ cuando se usa tronco de palma aceitera (Noparat et al., 2011) y $1,3 \text{ mol H}_2 \text{ mol} \cdot \text{glucosa}^{-1}$ con una mezcla de medios gastados de *Epicoccum nigrum*

(Hongo del filo *Ascomycota*) (Khalil et al., 2014); ambos superiores al rendimiento obtenido en este estudio.

Con la concentración de glucosa intermedia de $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ se obtuvo el mayor rendimiento experimental de 0,936 de moles de H_2 por mol de fructosa, denotando que altas concentraciones de sustrato pueden ser desfavorables para la producción de H_2 , ya que la actividad de los microorganismos productores de hidrógeno puede inhibirse de varias maneras (Ciranna et al., 2014), posiblemente debido a inhibiciones metabólicas causadas por la acumulación de ácidos orgánicos, mayor osmolalidad en el medio de cultivo y cambios en el perfil de metabolitos (Van et al., 2003).

Conclusiones

La bacteria *Clostridium acetobutylicum* fue capaz de metabolizar la fructosa en su proceso, sin embargo, presentó menores rendimientos en la generación de hidrógeno a comparación de las investigaciones realizadas usando glucosa. Se alcanzó un porcentaje entre 27,2 % y 51,6 %, en relación al teórico.

La cinética de crecimiento varió dependiendo de la concentración del sustrato, lo que presentó variabilidad en la producción de gas, concentración celular y consumo de azúcar, es así que la mayor producción volumétrica de hidrógeno se dio en la concentración de 2,5 g·L⁻¹ para la cepa silvestre, donde se obtuvo 1,73·10⁻² L·L⁻¹ h⁻¹ y un rendimiento experimental de 0,936 mol de H₂ por mol de fructosa.

Ecuador al ser un país agrícola, genera gran cantidad de residuos que pueden ser aprovechables como sustrato para el metabolismo de la bacteria sin afectar la eficiencia de la producción de hidrógeno, lo que permite reducir los costos en el proceso, identificando el cultivo de banano, el cacao y la caña de azúcar como posibles alternativas.

Recomendaciones

Incluir análisis de los subproductos generados por el metabolismo durante el proceso de fermentación anaeróbica, para determinar si pueden ser aprovechados.

Realizar experimentaciones a mayor escala para evaluar la viabilidad industrial del proceso.

Analizar el pH antes de esterilizar y después para identificar que no exista variación y el cultivo este creciendo en un pH correcto ya que si no es así la producción de hidrógeno y subproductos se verá afectada.

Verificar que el medio de cultivo esté en condiciones anóxicas, en este caso se puede colocar un indicador de oxígeno como es el caso de la rizasurina.

Se podría emplear cultivos mixtos entre *Clostridium acetobutylicum* y otra cepa como *Enterobacter aerogenes* (Tondro et al., 2020) para alcanzar mayor producción de hidrógeno.

Combinación de sustratos como glucosa y fructosa para adaptar de mejor manera el microorganismo, con el paso del tiempo en el medio de cultivo se podría ir desplazando la glucosa por el total de fructosa.

Referencias

- Abd-Alla, M., & El-Enany, A. (2012). Production of acetone-butanol-ethanol from spoilage date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits by mixed culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Bacillus subtilis*. *Biomass and Bioenergy*, 42, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.03.006>
- Alcántar, M., Campos, J., & Ibarra, A. (2021). Desregulación metabólica y consecuencias clínicas por el consumo de fructosa. *TIP. Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 24. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.332>
- Alonso, J., Domínguez, H., Garrote, G., González, M., Gullón, B., Moure, A., Santos, V., Vila, C., & Yáñez, R. (2011). Biorefinery processes for the integral valorization of agroindustrial and forestal wastes. In *CYTA - Journal of Food* (Vol. 9, Issue 4, pp. 282–289). <https://doi.org/10.1080/19476337.2011.598949>
- Azman, N., Abdeshahian, P., Kadier, A., Nasser, N., Salih, N., Lananan, I., Hamid, A., & Kalil, M. (2016). Biohydrogen production from de-oiled rice bran as sustainable feedstock in fermentative process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(1), 145–156. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2015.10.018>
- Baeyens, J., Zhang, H., Nie, J., Appels, L., Dewil, R., Ansart, R., & Deng, Y. (2020). Reviewing the potential of bio-hydrogen production by fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110023>
- Bailón, J., & Jiménez, E. (2021). *Simulación del proceso para la obtención de biobutanol a partir de los residuos agroindustriales proveniente de la paja de arroz* [Universidad de Guayaquil]. <https://repositorio.ug.edu.ec/server/api/core/bitstreams/d79cd1d7-273a-4568-81fc-157ac7acbc15/content>
- Bedoya, A., Camilo, J., Ramírez, J., & Vásquez, J. (2008). Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. *Año*, 75, 137–157. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49615415>

- Brito, M., & Martins, F. (2017). Life cycle assessment of butanol production. *Fuel*, 208, 476–482. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.07.050>
- Bundhoo, Z., & Mohee, R. (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(16), 6713–6733. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>
- Burgos, L. (2020). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Questionar: Investigación Específica*, 7(1), 57–66. <https://doi.org/10.29097/23461098.308>
- Calderón, M., Andrade, F., Lizarzaburu, L., & Masache, M. (2017). Valoración económica de los cobeneficios del aprovechamiento energético de los residuos agrícolas en el Ecuador. *Comisión Económica Para América Latina y El Caribe (CEPAL)*. <https://repositorio.cepal.org/server/api/core/bitstreams/d80ae335-b3c9-41ae-90c6-ae426b167b67/content>
- Cancino, R. (2021). *Producción y almacenamiento de hidrógeno verde para aplicaciones energéticas en Chile* [Universidad de Chile]. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/181631>
- Castillo, P., García, R., & Duran, C. (2003). *El consumo de fructosa: riesgos para la salud y la economía*. Académia Mexicana de Ciencias. https://amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/54_2/consumo_fructuosa.pdf
- Chen, J., & Mortenson, L. (1974). Purification and properties of hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* W5. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 371(2), 283–298. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(74\)90025-7](https://doi.org/10.1016/0005-2795(74)90025-7)
- Chen, X., Sun, Y., Xiu, Z., Li, X., & Zhang, D. (2006). Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(4), 539–549. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2005.03.013>

- Chong, M., Sabaratnam, V., Shiray, Y., & Hassan, M. (2009). Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(8).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319909002079>
- Ciranna, A., Ferrari, R., Santala, V., & Karp, M. (2014). Inhibitory effects of substrate and soluble end products on biohydrogen production of the *alkalithermophile Caloramator celer*: Kinetic, metabolic and transcription analyses. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(12), 6391–6401. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2014.02.047>
- Coloma, H. (2024). Estudio de caso: tecnologías de producción de hidrógeno verde para Ecuador. *Researchgate*. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.36255.37285>
- Das, D., & Veziroğlu, N. (2001). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26(1).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319900000586>
- Doran, P. (2013). *Bioprocess Engineering Principles* (2nd ed.). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/C2009-0-22348-8>
- Feria, A., De la Cruz, D., Pérez, H., Pacheco, J., Torres, J., & López, I. (2022). Producción biológica de hidrógeno mediante fermentación oscura. *Journal of Basic Sciences*, 8(23), 45–56. <https://revistas.ujat.mx/index.php/jobs/article/view/5344>
- Flores, C. (2022). *Sistemas de electrofermentación para la producción de biobutanol a partir de Clostridium acetobutylicum* [Universidad Autónoma de Querétaro]. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/8628>
- García, D. (2021). *Estrategias para mejorar la estabilidad de un catalizador de NiAl₂O₄ en la producción de H₂ mediante reformado con vapor del bio-oil*.
<https://addi.ehu.es/handle/10810/54250>
- Gomez, F., González, G., Restrepo, M., Montiel, A., Álvarez, K., Linares, R., & Hernández, S. (2022). Residuos de frutas y vegetales como materias primas para la producción de

- biocombustibles: potencial en el estado de Guanajuato. *Digital Ciencia@UAQRO*, 15(1). <https://revistas.uaq.mx/index.php/ciencia/article/view/697>
- Gómez, F., Puentes, L., De Sisto, A., Porco, A., & Betancourt, P. (2020). Preliminary Evaluation of the Dearomatization Capacity of Bacterial Isolates on a Refinery Current (Light Cycle Oil). *Ciencia En Revolución*, 6(19), 128–136. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4625781>
- Guerrero, K., Gallardo, R., Paredes, I., Quintero, J., Mau, S., Conejeros, R., Gentina, J. C., & Aroca, G. (2021). Continuous biohydrogen production by a degenerated strain of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(7), 5100–5111. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.11.104>
- Guiltinan, M., Eun Oh a, S., Zuo b, Y., & Zhang, H. (2009). Hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and megaplasmid-deficient mutant M5 evaluated using a large headspace volume technique. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(23). <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319909015249>
- Hallenbeck, P., & Benemann, J. (2002). Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11–12), 1185–1193. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00131-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00131-3)
- Hassan, E., Abd-Alla, M., Khalil, M., & Morsy, F. (2015). In situ hydrogen, acetone, butanol, ethanol and microdiesel production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 from oleaginous fungal biomass. *Anaerobe*, 34, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.05.007>
- Ibrahim, M., Abd, S., Yusoff, M., Phang, L., & Hassan, M. (2015). Simultaneous enzymatic saccharification and ABE fermentation using pretreated oil palm empty fruit bunch as substrate to produce butanol and hydrogen as biofuel. *Renewable Energy*, 77, 447–455. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.12.047>

- Janssen, H., Wang, Y., & Blaschek, H. P. (2014). CLOSTRIDIUM | *Clostridium acetobutylicum*. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 449–457. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00070-7>
- Kashket, E., & Zhi, C. (1995). Clostridial strain degeneration. *FEMS Microbiology Reviews*, 17(3), 307–315. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(95\)00012-2](https://doi.org/10.1016/0168-6445(95)00012-2)
- Khalil, M., Abd, M., Morsy, F., & Hassan, E. (2014). Two stage biodiesel and hydrogen production from molasses by oleaginous fungi and *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(7), 3185–3197. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.12.106>
- Kim, S., Hwang, J., Kim, H., Oh, S., Kim, H., Shin, N., Kim, S., Park, J., Bhatia, S., & Yang, Y. (2023). Enhancement of biohydrogen production in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 by overexpression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Enzyme and Microbial Technology*, 168. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2023.110244>
- Kutzenok, A., & Aschner, M. (1952). Degenerative processes in a strain of *Clostridium Butylicum*. *Journal of Bacteriology*, 64(6), 829–836. <https://doi.org/10.1128/jb.64.6.829-836.1952>
- Lara, M., & Méndez, E. (2021). *Evaluación de la producción de hidrógeno en un bioreactor a escala banco empleando bacterias de la especie Clostridium Butyricum a partir de cáscaras de banano (Musa cavendish)*. [Fundación Universidad de América]. <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7609/1/6131996-2019-2-IQ.pdf>
- Leticia, M., Alicia, C., Gustavo, R., Mónica, C., & Lick, I. (2024). Sustainable production of 5-hydroxymethylfurfural from fructose and inulin using active and stable acidic ionic liquids as homogeneous and heterogeneous catalysts. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 39. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2024.101576>

- Liu, J., Zhou, W., Fan, S., Qiu, B., Wang, Y., Xiao, Z., Tang, X., Wang, W., Jian, S., & Qin, Y. (2019). Coproduction of hydrogen and butanol by *Clostridium acetobutylicum* with the biofilm immobilized on porous particulate carriers. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(23), 11617–11624. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2019.03.099>
- Lopes, A., & Abreu, F. (2020). Utilization of carbon nanotubes in hydrogen electrosynthesis from tropical fruit fermentation. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 25(3). <https://doi.org/10.1590/s1517-707620200003.1121>
- López, N. (2022). *Estudio de la producción de H₂ por bacterias del género Clostridium mediante el análisis de sus rutas metabólicas y la modelación de flujos metabólicos*. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/187381>
- Mahecha, E. (2018). *Uso del Hidrógeno como fuente alternativa para alimentar pilas de combustible* [Fundación Universidad América]. <https://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/7136>
- Martínez, I. (2015). *Estudio de un reactor de lecho catalítico para la producción de hidrógeno a partir de bioetano* [Universidad Autónoma Metropolitana]. <https://zaloamati.azc.uam.mx/handle/11191/6076>
- Martinez, W., de Souza, E., Pedroni, A., Carvalho, J., Oliveira, V., Soccol, C., & Sydney, E. (2021). Hydrogen: Current advances and patented technologies of its renewable production. In *Journal of Cleaner Production* (Vol. 286). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124970>
- Masset, J., Calusinska, M., Hamilton, C., Hilgsmann, S., Joris, B., Wilmotte, A., & Thonart, P. (2012). Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium* spp. *Biotechnology for Biofuels*, 5. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-35>

- Molina, C., Hernández, R., & Jiménez, U. (1996). Cinética de la producción de Acetona-Butanol utilizando el *Clostridium acetobutylicum*. *Ingeniería*, 5(1).
<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/ingenieria/article/download/7537/7208>
- Momirlan, M., & Veziroglu, T. (2005). The properties of hydrogen as fuel tomorrow in sustainable energy system for a cleaner planet. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(7), 795–802. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.10.011>
- Morsy, F., Abd-Halla, M., & El-Enany, A. (2011). Hydrogen production from rotten dates by sequential three stages fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319911017587>
- Nikolaidis, P., & Poullikkas, A. (2017). A comparative overview of hydrogen production processes. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 67, pp. 597–611). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.044>
- Noparat, P., Prasertsan, P., & Tanga, S. (2011). Isolation and characterization of high hydrogen-producing strain *Clostridium beijerinckii* PS-3 from fermented oil palm sap. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 14086–14092.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.04.143>
- Noriega, L. (2017). *Producción de butanol por Clostridium acetobutylicum en cultivo semicontinuo* [Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politecnico Nacional]. <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/1393>
- Rezaeitavabe, F., Saadat, S., Talebbeydokhti, N., Sartaj, M., & Tabatabaei, M. (2020). Enhancing bio-hydrogen production from food waste in single-stage hybrid dark-photo fermentation by addition of two waste materials (exhausted resin and biochar). *Biomass and Bioenergy*, 143. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105846>
- Rivera, G. (2016). “El hidrógeno como fuente alterna de energía.”
<https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/1453/SSIT0014060.pdf>

- Rosas, D., Ortiz, H., Herrera, J., & Leyva, O. (2016). Revalorización de algunos residuos agroindustriales y su potencial de aplicación a suelos agrícolas. *Agroproductividad*, 9(8), 18–23. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/796>
- Sánchez, R., & Silva, R. (2009). Combustible hidrógeno para el ciclo Rankine. *Educación Química*, 20(2). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0187893X18300247#bbib0050>
- Singh, L., Wahid, Z., Siddiqui, M., Ahmad, A., Rahim, M., & Sakinah, M. (2013). Biohydrogen production from palm oil mill effluent using immobilized *Clostridium butyricum* EB6 in polyethylene glycol. *Process Biochemistry*, 48(2), 294–298. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.12.007>
- Sinha, P., & Pandey, A. (2011). An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13), 7460–7478. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2011.03.077>
- Soares, J., Confortin, T., Toderó, I., Mayer, F., & Mazutti, M. (2020). Dark fermentative biohydrogen production from lignocellulosic biomass: Technological challenges and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 117, 109484. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2019.109484>
- Son, Y., Jeon, J., Kim, D., Yang, Y., Jin, Y., Cho, B., Kim, S., Kumar, S., Lee, B.-D., & Yoon, J.-J. (2021). Improved bio-hydrogen production by overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and FeFe hydrogenase in *Clostridium acetobutylicum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(74), 36687–36695. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.08.222>
- Tondro, H., Musivand, S., Zilouei, H., Bazarganipour, M., & Zargoosh, K. (2020). Biological production of hydrogen and acetone- butanol-ethanol from sugarcane bagasse and rice straw using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium acetobutylicum*.

- Biomass and Bioenergy*, 142, 105818.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2020.105818>
- Towler, B. (2014). Hydrogen. In *The Future of Energy* (pp. 313–333). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801027-3.00015-4>
- Truong, C., Verma, V., Mishra, P., Suh, Y., & Mishra, D. (2022). Catalytic transformation of biomass-based feedstocks in green solvents. *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Biochemicals and Materials Production from Sustainable Biomass Resources*, 673–720. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824419-7.00004-2>
- Uyeda, K., & Rabinowitz, J. C. (1971). Pyruvate-Ferredoxin Oxidoreductase: IV. STUDIES ON THE REACTION MECHANISM. *Journal of Biological Chemistry*, 246(10), 3120–3125.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)62203-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)62203-3)
- Valdez, I., Castillo, L., Pérez, M., Sepúlveda, A., & Vargas, A. (2019). Enhanced hydrogen production from lignocellulosic substrates via bioaugmentation with *Clostridium* strains. *Industrial Crops and Products*, 137, 105–111.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.023>
- Van, E., Claassen, P., & Stams, A. (2003). Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(3), 255–262. <https://doi.org/10.1002/bit.10463>
- Vargas, Y., & Pérez, L. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales para el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Historia Del Artículo Resumen | Abstract* |, 14(1), 59–72. <https://doi.org/10.18359/rfcb.xxxx>
- Voigt, C., Bahl, H., & Fischer, R.-J. (2014). Identification of PTSFru as the major fructose uptake system of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(16), 7161–7172. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5809-1>

- Wang, J., & Yin, Y. (2021). Clostridium species for fermentative hydrogen production: An overview. In *International Journal of Hydrogen Energy* (Vol. 46, Issue 70, pp. 34599–34625). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.08.052>
- Wu, X., Huang, G., Bai, L., Long, M., & Chen, Q. (2014). Enhanced hydrogen production from xylose and bamboo stalk hydrolysate by overexpression of xylulokinase and xylose isomerase in *Klebsiella oxytoca* HP1. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(1), 221–230. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2013.10.078>
- Yepes, C., Milena, S., Naranjo, M., Johana, L., & Sánchez, O. (2008). Valorización de residuos agroindustriales - frutas en Medellín y el sur del Valle del Aburrá, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 61(1), 4422–4431. <https://www.redalyc.org/pdf/1799/179914077018.pdf>
- Zhang, H., Bruns, M. A., & Logan, B. E. (2006). Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. *Water Research*, 40(4), 728–734. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2005.11.041>

Apéndice

Apéndice A. Curva de calibración de azúcares reductores por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)

Se preparó la solución de DNS mezclando a temperatura ambiente 1 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 30 g de tartrato de sodio y potasio y 1,5 g de hidróxido de sodio, se aforó a 100 mL de agua destilada y se almacenó en frasco ámbar a temperatura de 4°C.

Se preparó una solución patrón de fructosa y se añaden 0,25 mL de cada solución y 0,25 mL del reactivo DNS en tubos tapa rosca cubiertos con papel aluminio para proteger la reacción de la luz. Los tubos se colocan en un baño termostático a 92 °C por cinco minutos. Se detiene la reacción por enfriamiento en hielo por cinco minutos y se agregó 2,5 mL de agua destilada a cada tubo, se agito en un vortex y se realizó la lectura de la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro UV-Visible Thermoscientific Helios Epsilon (Burgos, 2020). En la Tabla A1 se resume las cantidades de glucosa, reactivo y agua destilada agregadas para cada muestra.

Tabla A1

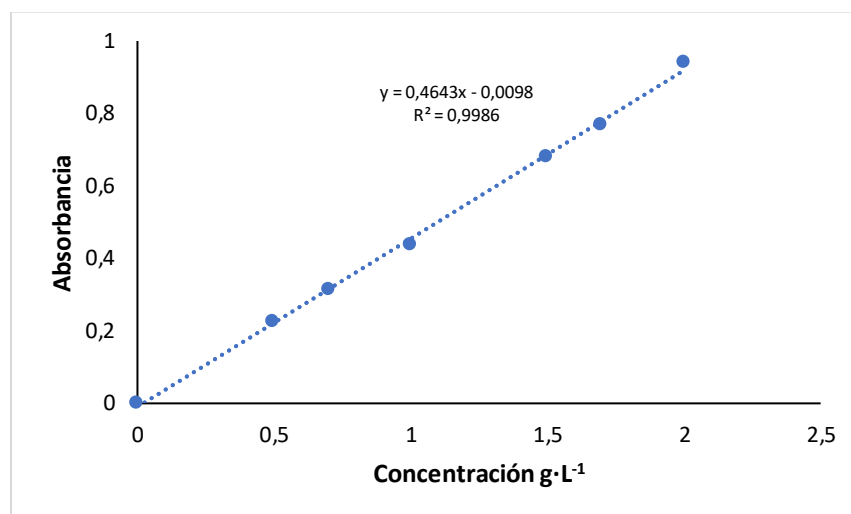
Metodología para elaborar la curva patrón de glucosa

Reactivo	Blanco	Concentración (g·L ⁻¹)					
		0,5	0,7	1,0	1,5	1,7	2,0
Glucosa (mL)	-	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Agua (mL)	0,25	-	-	-	-	-	-
Reactivo DNS (mL)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Agua destilada (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Nota. Tomado de Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico.

Figura A1

Cueva de calibrado de glucosa



Apéndice B. Determinación de concentración celular

Técnica turbidimétrica

Para la estimación de las concentraciones de células en un medio líquido con células se utilizó la técnica de la turbidimetría. Este método depende de la relación entre absorbancia y concentración celular, donde se mide la cantidad de luz residual transmitida utilizando un espectrofotómetro UV-Visible Thermoscientific Helios Epsilon a una longitud DO_{600} cada lectura se hizo por duplicado.

Para generar una curva de calibración se tomó una muestra del medio de cultivo de concentración celular conocida a la que se realizan diluciones en serie como se muestra en la Tabla B1.

Tabla B1

Factor de dilución para hacer la curva de biomasa

Factor dilución (FD)	NaCl	Inóculo
1	0,9	0,1
2	0,8	0,2
3	0,7	0,3
4	0,6	0,4
5	0,5	0,5
6	0,4	0,6
8	0,3	0,7
9	0,2	0,8
10	0,1	0,9

Con los datos obtenidos, se elaboró una regresión lineal donde se tiene una ecuación la cual permite conocer la concentración celular de una muestra desconocida, la muestra problema se diluyo con una solución de NaCl 2,5mM para medirla en el espectrofotómetro, se consideró que el valor no debe estar fuera del rango de linealidad, este valor se reemplazó en la curva de calibrado a partir del despeje de concentración.

$$y = m \cdot x + b$$

Donde,

Y: concentración celular ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

m: pendiente de la recta

x: Absorbancia medida de la muestra

b: intercepto

Método del peso seco

Para encontrar la masa seca de las células, se utilizó el método de peso seco, el cual consistió en la separación física del microorganismo del medio líquido que contiene para obtener su peso constante, por ende, del mismo medio inoculado con el que se realizó las diluciones por la técnica de turbidimetría se centrifugo en tres tubos para centrifuga de 10 mL con 5 mL del caldo de cultivo cada uno a 6000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 9°C, luego se retiró el sobrenadante para añadir 10 mL de cloruro de sodio (NaCl) al 2,5mM se centrifugo nuevamente y se retiró el sobrenadante este proceso se realizó 3 veces, posterior a ello el pellet obtenido se depositó en un crisol previamente secado y pesado y se llevó a la estufa a 105°C durante 12 horas, se enfrió durante 30 min en un desecador, luego se obtuvo el peso seco mediante la diferencia entre pesos de las tres muestras para luego realizar un promedio, siguiendo la siguiente ecuación.

$$M = \frac{M2 - M1}{V}$$

Donde,

M: concentración celular ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

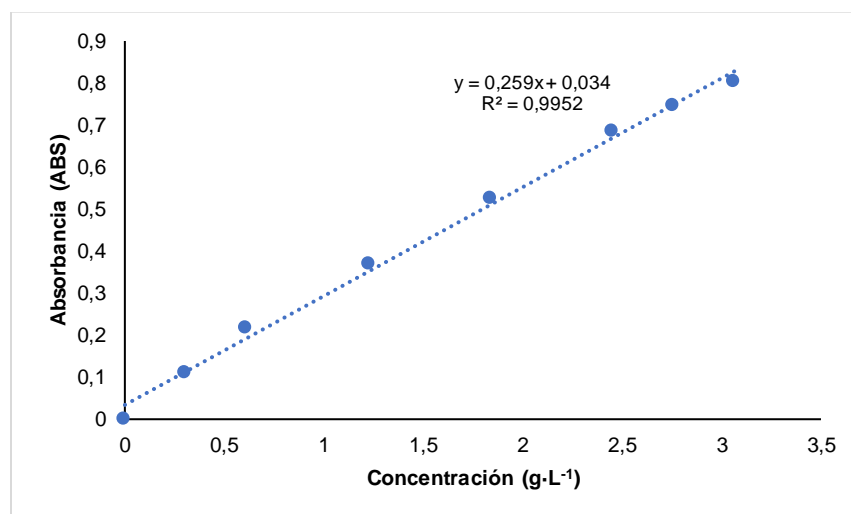
M1: masa inicial del crisol (g)

M2: masa final del crisol (g)

V: volumen de la muestra (L)

Figura B1

Curva de calibrado de biomasa del medio con fructosa



Apéndice C. Memoria de cálculos

Cálculos para la obtención del volumen teórico de hidrógeno con fructosa como fuente de carbono como ejemplo en la primera concentración con cepa degenerada.

A partir de la reacción estequiométrica:



De la reacción anterior se puede verificar que por 4 moles de fructosa se obtiene 6 moléculas de Hidrógeno molecular.

Aplicando la ecuación de los gases ideales ($PV = nRT$) se puede calcular el volumen total de gas obtenido a partir de glucosa como fuente de carbono, en donde se obtiene:

$$PV = nRT$$

Donde:

P = Presión atmosférica (atm)

V = volumen (L)

n = número de moles (mol)

R = constante universal de los gases ideales ($\text{atm L mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)

T = temperatura (K)

Tomando en cuenta las siguientes consideraciones y reemplazando en la ecuación anterior:

Tabla C1

Consideraciones para la ecuación de los gases ideales

Consideración	Símbolo	Valores
Presión atmosférica en la ciudad de Loja	P	0,7 atm
Constante universal de los gases ideales	R	0,08206 atm. L·mol ⁻¹ K ⁻¹
Temperatura de la incubadora	T	310,15 K

$$V = \frac{6 \times \left(0,08206 \frac{\text{atm} \cdot \text{L}}{\text{mol} \cdot \text{K}}\right) \times (310,15 \text{K})}{0,7 \text{ atm}} = 218,151 \text{ L}$$

La producción de 218,151 L de H₂ son obtenidos cuando el consumo de las 4 moles de fructosa es total, se conoce que el peso molecular de 1 mol de fructosa es 180,16 g mol⁻¹, es decir, 720,64 g/4 mol fructosa.

Para el análisis de la investigación, la experimentación se realizó en un volumen de 30 mL de medio de cultivo RCM modificado, el cual contiene de azúcar: 1g·L⁻¹ y 0,903 g·L⁻¹ de azúcar del propio medio, es decir, 0,06 g de azúcar incluido.

Se procede a calcular el número de moles de fructosa a partir de la masa contenida en el medio de cultivo y su peso molecular (PM= 180,16 g·mol⁻¹)

$$1 \text{ mol fructosa} \rightarrow 180,16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$x \qquad \qquad \qquad 0,06 \text{ g fructosa}$$

$$x = 3,325 \times 10^{-4} \text{ moles de fructosa}$$

Conociendo cuantos moles de fructosa existen en el medio de cultivo, se puede obtener el número de moles de hidrógeno producidos.

$$4 \text{ mol fructosa} \qquad \qquad \qquad 6 \text{ mol H}_2$$

$$3,325 \times 10^{-4} \text{ moles de fructosa} \qquad \qquad \qquad x$$

$$x = 4,99 \times 10^{-4} \text{ mol H}_2$$

El valor obtenido se reemplaza nuevamente en la ecuación de gases ideales y se obtiene el volumen teórico de producción de Hidrógeno obtenido, considerando el consumo completo de la fructosa por la bacteria.

$$V = \frac{4,99 \times 10^{-4} \text{ mol H}_2 \times \left(0,08206 \frac{\text{atm} \cdot \text{L}}{\text{mol} \cdot \text{K}}\right) \times (310,15 \text{ K})}{0,7 \text{ atm}} = 1,814 \times 10^{-2} \text{ L o } 18,136 \text{ mL H}_2$$

Cálculos para la obtención del rendimiento teórico y práctico de hidrógeno usando fructosa como fuente de carbono como ejemplo en la primera concentración con la cepa degenerada.

El rendimiento teórico y práctico de hidrógeno se obtiene usando la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento de } H_2 = \frac{\text{moles de hidrógeno producido}}{\text{moles de glucosa consumida}} = [\text{moles de } H_2 \text{ por mol de glucosa}]$$

En el caso del rendimiento teórico se considera la reacción estequiométrica presentada para glucosa, en donde se indica que 4 moles de glucosa producen 6 moles de H_2 .

$$\text{Rendimiento de } H_2 = \frac{6 \text{ moles de hidrógeno producido}}{4 \text{ moles de glucosa consumida}} = 1.5 [\text{moles de } H_2 \text{ por mol de glucosa}]$$

Para el cálculo del rendimiento práctico o experimental de gas, se procede a partir del volumen experimental obtenido en la cinética y se calcula el número de moles a partir de la ecuación de gases ideales y las consideraciones de presión y temperatura mencionadas anteriormente.

$$n = \frac{PV}{RT}$$

$$n = \frac{0,7 \text{ atm} \times (0,01475L)}{\left(0,08206 \frac{\text{atm} * L}{\text{mol} * K}\right) \times (310,15K)} = 4,057 \times 10^{-4} \text{ moles gas}$$

Conociendo que por 4 moles de fructosa se producen 6 moles de H_2 y 4 moles de CO_2 , es decir 10 moles de gas teóricos, se establece una relación usando los moles de gas producidos anteriormente.

$$n = \frac{4,057 \times 10^{-4} \text{ moles gas} \times (6 \text{ mol } H_2)}{10 \text{ mol gas}} = 2,434 \times 10^{-4} \text{ mol } H_2$$

Usando el consumo de fructosa experimental por el consorcio del género *Clostridium*, el PM de la fructosa ($180,16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) y el volumen de trabajo (30 mL) se obtienen los moles de fructosa:

$$n = \frac{1,679 \text{ gL}^{-1} \times (0,03L)}{180,16 \text{ g mol}^{-1}} = 2,797 \times 10^{-4} \text{ moles fructosa}$$

Reemplazando estos valores en la ecuación de rendimiento se tiene que:

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento de } H_2 &= \frac{2,434 \times 10^{-4} \text{ moles de hidrógeno producido}}{2,797 \times 10^{-4} \text{ moles de fructosa consumida}} \\ &= 0,870 [\text{moles de } H_2 \text{ por mol de glucosa}] \end{aligned}$$

Cálculos para la obtención del volumen experimental de hidrógeno con fructosa como fuente de carbono como ejemplo en la primera concentración de sin choque térmico.

Conocidos los moles de hidrógeno producido en la experimentación se procede a aplicar nuevamente la fórmula de los gases ideales para determinar el volumen de hidrógeno experimental:

$$V = \frac{2,434 \times 10^{-4} \text{ mol } H_2 \times \left(0,08206 \frac{\text{atm} \cdot \text{L}}{\text{mol} \cdot \text{K}}\right) \times (310,15 \text{ K})}{0,7 \text{ atm}} = 8,85 \times 10^{-3} \text{ L u } 8,85 \text{ mL } H_2$$

Cálculos para la determinación de la tasa de productividad como ejemplo en la primera concentración de la cepa degenerada.

Con respecto a la productividad se obtuvo en función de los productos generados, el volumen de fermentación y el tiempo de fermentación, a partir de la siguiente ecuación.

$$\text{Productividad} = \frac{\text{producto generado (l)}}{(\text{volumen de fermentación (L)})(\text{tiempo de fermentación (h)})}$$

$$\text{Productividad} = \frac{8,85 \times 10^{-3} \text{ L}}{(0,03 \text{ L})(19 \text{ h})}$$

$$\text{Productividad} = 1,55 \times 10^{-2} \text{ L L}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

Cálculo de la tasa de crecimiento específico máxima como ejemplo en la primera concentración con cepa degenerada.

Para el cálculo de la tasa de crecimiento específico máxima en h^{-1} se utilizó una ecuación logística modificada.

$$x = \frac{x_0 x_m e^{\mu_m t}}{x_m - x_0 + x_0 e^{\mu_m t}}$$

Donde:

X_0 = Concentración celular inicial

X_m = Concentración celular máxima

X = Concentración celular final

μ_m = Velocidad de crecimiento máxima

t = tiempo

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{x * x_m - x_0 * x_m}{x_0 * x_m - x * x_0}\right)}{t}$$

Se despeja la fórmula para obtener las diferentes velocidades como ejemplo en la primera concentración con la cepa degenerada (SCT).

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{1,666 \text{ g L}^{-1} * 1,926 \text{ g L}^{-1} - 1,666 \text{ g L}^{-1} * 0,041 \text{ g L}^{-1}}{0,041 \text{ g L}^{-1} * 1,926 \text{ g L}^{-1} - 1,666 \text{ g L}^{-1} * 0,041 \text{ g L}^{-1}}\right)}{19 \text{ h}}$$

Tabla C1

Velocidad específica de crecimiento de Clostridium acetobutylicum en 1 g·L⁻¹ (SCT)

Datos	Valor	μ _{max}
X ₀	0,041	
X _m	1,926	
X	1,666	0,279
t	19	

Nota. Determinación en base a la cinética de crecimiento. Los datos corresponden a los valores medios ± DE (n=6).

Cálculos para los rendimientos de biomasa como ejemplo en la primera concentración con la cepa degenerada.

Se aplica para determinar cuanta biomasa se produce a partir de un gramo de sustrato, considerando el pico máximo de biomasa

$$Y_{xs} = \frac{\Delta X}{-\Delta S}$$

ΔX = biomasa producida (g · L⁻¹)

ΔS = sustrato consumido (g · L⁻¹)

Tabla C2

Rendimiento de biomasa de Clostridium acetobutylicum en 1 g·L⁻¹ en la cepa silvestre

Datos	Valor	Y _{xs}
X _o	0,041	
X _f	1,926	1,183

S_o	1,977
S_f	0,383

Nota. Rendimiento de biomasa considerando su pico máximo. X_o= Biomasa inicial (g·L⁻¹).

X_f= Biomasa final (g·L⁻¹). S_o = Sustrato inicial (g·L⁻¹). S_f= Sustrato final (g·L⁻¹).

Apéndice D. Análisis estadístico

Tabla D1

Análisis de varianza (ANOVA) para la producción de gas (mL), en base a la concentración y el tratamiento.

Source of Variation	Sum of sqrs (SS)	df	Mean square (MS)	F	P-value	
Choque	40,333	1	40,333	18,43	0,00513	**
				1	1	
Concentración	245,375	2	122,687	56,06	0,00013	**
				4	1	*
Choque*Concentración	114,292	2	57,146	26,11	0,00109	**
				4	4	
Error	13,13	6	2,188			
Total	4859,880	1				
		2				
Corrected Total	413.130	1				
		1				

Nota. ANOVA para las tres concentraciones y las dos cepas (degenerada y silvestre) durante la cinética de crecimiento. Choque: cepa. df: grados de libertad. F: estadístico del ANOVA. Signif. codes: 0 '***' 0.001

'**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tabla D2

Análisis de varianza (ANOVA) para el crecimiento celular (mL), en base a la concentración y el tratamiento.

Source of Variation	Sum of sqrs (SS)	df	Mean square (MS)	F	P-value	
Choque	0,2614	1	0,261	59,427	0,000249	**
					8	*
Concentración	8,5584	2	4,277	972,975	2,904E-	**
				2	07	*
Choque*Concentración	0,0411	2	0,020	4,6748	0,059726	.
					1	
Error	0,0264	6	0,004			
Total	120,311	1				
		2				
Corrected Total	9	1				
		1				

Nota. ANOVA para las tres concentraciones y las dos cepas (degenerada y silvestre) durante la cinética de crecimiento. Choque: cepa. df: grados de libertad. F: estadístico del ANOVA. Signif. codes: 0 '***' 0.001

'**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tabla D3

Análisis de varianza (ANOVA) para la concentración de azúcar ($g \cdot L^{-1}$), en base a la concentración y el tratamiento.

<i>Source of Variation</i>	<i>Sum of sqrs (SS)</i>	<i>d f</i>	<i>Mean square (MS)</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	
Choque	0,0048	1	0,005	1,1254	0,32958	
Concentración	9,0375	2	4,519	1048,8266	2,32E-08	** *
Choque*Concentración	0,0317	2	0,016	3,6837	0,09043	.
Error	0,0259	6	0,004			
Total	95,476					
Corrected total	9,100					

Nota. ANOVA para las tres concentraciones y las dos cepas (degenerada y silvestre) durante la cinética de crecimiento. Choque: cepa. df: grados de libertad. F: estadístico del ANOVA. Signif. codes: 0 '***' 0.001

'**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1