Conception production and application of a photosynthetic process for the hydrogen production from whey.

Patricia Castillo Moreno

▶ **To cite this version:**

Patricia Castillo Moreno. Conception production and application of a photosynthetic process for the hydrogen production from whey.. Fluids mechanics [physics.class-ph]. Université Grenoble Alpes; Universidad nacional de Colombia, 2018. Español. NNT : 2018GREAI029 . tel-01859398

HAL Id: tel-01859398

https://theses.hal.science/tel-01859398

Submitted on 22 Aug 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Communauté
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

INSERER LE LOGO DE
L'UNIVERSITE PARTENAIRE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Préparée dans le cadre d'une cotutelle *entre la Communauté Université Grenoble Alpes* et Universidad Nacional de Colombia

Spécialité : IMEP2/MECANIQUE DES FLUIDES, PROCEDES ENERGETIQUE.

Arrêté ministériel : le 6 janvier 2005 – 25 mai 2016

Présentée par

«Patricia / CASTILLO MORENO»

Thèse dirigée par **« Jean Pierre / MAGNIN »** et **« Juan Carlos / SERRATO »**

préparée au sein **des Laboratoires** d'Electrochimie et physicochimie des matériaux et des interfaces,Grenoble et Laboratorio de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia

dans **les Écoles Doctorales** Ingénierie - Matériaux, Mécanique, Environnement, Energétique, Procédés, Production Grenoble et Ingeniería química, Bogotá

Développement d'un procédé de production d'hydrogène photofermentaire à partir de lactosérum

Thèse soutenue publiquement le **« 17 mai 2018 »**,
devant le jury composé de :

M. Pedro Filipe, De BRITO BRANDAO
Professeur associé Universidad Nacional de Colombia, Président
M. Nicolas, BERNET
Directeur de Recherche LBE INRA, Rapporteur
Mme. Ruth Yolanda RUIZ PARDO
Professeur associé Universidad de la Sabana, Rapporteur
M. Yann, BULTEL
Professeur *Institut Polytechnique Grenoble Directeur Adjoint LEPMI,* Membre

Desarrollo de un proceso de producción fotofermentativa de hidrógeno a partir de suero de leche

Patricia Castillo Moreno

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá, Colombia
2018

Communauté Université de Grenoble Alpes, INPG
École Nationale Supérieure de Physique, *Électronique* et Matériaux (PHELMA)
Saint Martin d'Hères, France
2018

Desarrollo de un proceso de producción fotofermentativa de hidrógeno a partir de suero de leche

PATRICIA CASTILLO MORENO

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ingeniería Química
Docteur spécialité Ingénierie – Matériaux Mécanique Environnement Energie Procédés Production

Director Francia
Dr. Jean Pierre MAGNIN
Director Colombia
Dr. Juan Carlos SERRATO BERMUDEZ

Línea de Investigación:
Bioprocesos
Grupo de Investigación:
Procesos Químicos y Bioquímicos
Universidad Nacional de Colombia
Y
Laboratorio de Electroquímica y Fisicoquímica de los Materiales e Interfaces
Université de Grenoble

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá, Colombia
2018

Communauté Université de Grenoble
Alpes, INPG
École Nationale Supérieure de Physique, *Électronique* et Matériaux (PHELMA)
Saint Martin d'Hères, France
2018

“Happiness consists more in the small conveniences of pleasures that occur every day, than in great pieces of good fortune that happen but seldom to a man in the course of his life.”

Benjamin Franklin

Agradecimientos.

A Dios por darme la guía y fortaleza.

Al profesor Juan Carlos Serrato por su ayuda y apoyo.

A Jean Pierre Magnin, por su constante apoyo, confianza y orientación.

A mis compañeros del posgrado en especial a German y Fabian por sus siempre oportunos y acertados consejos.

Al personal administrativo del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental por su disposición y apoyo en conocimientos, materiales y espacios de trabajo.

Al programa de Becas Doctorales Nacional convocatoria 567. Que es una herramienta valiosa que el Estado a través de COLCIENCIAS otorga para mejorar el nivel de educación e investigación del país.

Finalmente quiero agradecer especialmente a mi familia por su incondicional apoyo y compañía durante los buenos y malos momentos.

Mis Padres Gloria y Santiago, por ser mi impulso, guía e inspiración. A mis hermanos Sara y Nicolás por ser mi fuente de positivismo y alegría.

A Camilo Ruiz por su apoyo incondicional y constante, su fortaleza, compañía y optimismo.

A mis amigas por su buena energía y apoyo en todo momento; Adriana y Jenny.
A Ookami dojo especialmente mi maestro Alejandro Diaz.

Resumen

El hidrógeno es un gas importante como fuente de energía limpia y como materia prima de algunas industrias. Los procesos biológicos de producción de hidrógeno están ganando importancia debido a las ventajas de sus condiciones operativas y la versatilidad en los sustratos utilizados. En este proyecto se desarrolló una metodología fotofermentativa de producción de hidrógeno utilizando suero de leche como sustrato para la bacteria *Rhodobacter capsulatus* cepas IR3::LacZ y B10::LacZ. El proyecto se realizó en tres etapas las cuales se representan en los diferentes capítulos. En la primera etapa se utilizó suero de leche sintético para identificar los factores más relevantes para la producción de hidrógeno utilizando la metodología de diseño de experimentos. Como resultado de esta etapa se obtuvieron 4 modelos estadísticos para cada cepa y solución amortiguadora. Se eligió la cepa IR3::LacZ para los experimentos de las etapas posteriores. La productividad máxima y el rendimiento producto sustrato $Y_{P/S}$ obtenidos para la primera etapa fueron 64 ml $h^{-1}L^{-1}$ y 2.08 mol H_2 mol^{-1} C (C se refiere a las fuentes de carbono en este caso lactosa y lactato) para la solución amortiguadora fosfato y 43.01 ml $h^{-1}L^{-1}$ y 2.52 mol H_2 mol^{-1} C para la solución Kolthoff. La segunda etapa evaluó la producción de hidrógeno con suero de leche industrial. Se aplicó un pretratamiento de tres etapas: reducción de contenido graso, desproteinización y pasteurización. Se obtuvo un modelo validado que describe la producción de hidrógeno para la solución amortiguadora fosfato. La productividad volumétrica máxima y el $Y_{P/S}$ fueron 45.93 ml $h^{-1}L^{-1}$ y 2.29 mol H_2 mol^{-1} C respectivamente. Se analizó la influencia de una etapa de homofermentación láctica en el pretratamiento obteniendo que mejora la producción de hidrógeno con una productividad volumétrica de 69.71 ml $h^{-1}L^{-1}$ y un $Y_{P/S}$ de 2.96 mol H_2 mol^{-1} C. La tercera etapa fue el escalamiento de los experimentos a reactores. Se evidenció contaminación en los reactores la cual llevó a una alta producción de biogás compuesto exclusivamente por H_2 y CO_2 este último en una concentración no superior a 30% (v/v). Se concluyó que el proceso de producción integrada, uniendo la fermentación oscura y fotofermentación es una opción con gran potencial para el uso del suero de leche como sustrato en la producción de hidrógeno.

Palabras clave: Biohidrógeno, Fotofermentación, *Rhodobacter capsulatus, S*uero de leche.

Abstract

Hydrogen is an important gas that can be use as clean energy source and feedstock in some industries. Biological production methods are gaining importance due to their operational conditions and substrates versatility (including wastewater). During this project was develop a photofermentative hydrogen production methodology using cheese whey (CW) as a substrate of the bacteria *Rhodobacter capsulatus* strains IR3::LacZ and B10::LacZ . The project was made in three stages, each one represented in the different chapters. Synthetic whey was used during the first stage to identify the most relevant variables with the Design of Experiments methodology (DOE). As a result of the first stage were obtained four statistical models for each strain and buffer solution and the strain IR3::LacZ was selected to be use in the following stages. The maximum volumetric yield and the product/substrate yield $Y_{P/S}$ were 64 ml $h^{-1}L^{-1}$ and 2.08 mol H_2 mol^{-1} C (C is the carbon source in this case lactose and lactate) and 43.01 ml $h^{-1}L^{-1}$ and 2.52 mol H_2 mol^{-1} C for phosphate buffer and Kolthoff buffer, respectively. The second stage evaluated the production of hydrogen with industrial whey. A three-step pretreatment was applied to CW: fat reduction, deproteinization and sterilization. A validate statistical model describing hydrogen production was obtained for phosphate buffer. The maximum volumetric yield and the product/substrate yield $Y_{P/S}$ were 45.93 ml $h^{-1}L^{-1}$ and 2.29 mol H_2 mol^{-1} C, respectively. Lactic homofermetation was study as an additional step of the pretreatment improving the production yield. The volumetric productivity was 69.71 ml $h^{-1}L^{-1}$ and a $Y_{P/S}$ of 2.96 mol H_2 mol^{-1} C. The third stage was the scale-up of reactors. Bacterial contamination was observed which lead to a high biogas production exclusively composed of H_2 and CO_2, the last in a concentration not exceeding 30% (v/v). For this reason, it was concluded that the integrated production process coupling dark and photo fermentations is an option with great potential for the use of whey as substrate in the production of hydrogen.

Keywords: Biohydrogen, Photofermentation, *Rhodobacter capsulatus,* Cheese whey DOE.

Contenido

1. Generalidades de la investigación 5
1.1 Marco Teórico 5
1.1.1 Producción de Hidrógeno 6
1.1.2 Producción biológica de hidrógeno 8
- Hidrogenasa 9
- Nitrogenasa 9
1.1.3 Métodos de producción biológica 10
- Biofotólisis Directa 11
- Biofotólisis Indirecta 11
- Fotofermentación 12
- Fermentación oscura 13
- Producción integrada 14
1.1.4 Producción fotofermentativa de hidrógeno utilizando suero de leche como sustrato 16
1.1.4.1 Bacterias púrpuras no sulfurosas 17
1.1.4.2 Suero de leche 18
1.2 Objetivos 23
1.2.1 Objetivo General 23
1.2.2 Objetivo Específicos 23

2. Materiales y metodología general 24
2.1 Microrganismos utilizados 24
2.1.1 *Rhodobacter capsulatus* 24
2.1.2 Lactococcus lactis 25
2.2 Medios de cultivo 25
2.2.1 *Rhodobacter capsulatus* 25
2.2.2 Preparación del inóculo 26
2.2.3 Lactococcus lactis 26
2.3 Descripción del sistema de fermentación 26
2.4 Técnicas Analíticas 29
2.4.1 Determinación de pH 29
2.4.2 Determinación de azúcares y ácidos 29
2.4.3 Determinación de proteínas solubles 29
2.4.4 Determinación de H_2 y CO_2 29
2.5 Procesamiento de muestras 30
2.6 Diseño de experimentos 31

3. Modelamiento de la producción de hidrógeno con la bacteria *Rhodobacter capsulatus cepas IR3::LacZ y B10::LacZ:* Análisis con suero de leche sintético 35
3.1 Introducción 36
3.2 Métodos y Materiales 37
3.2.1 Microorganismo y medio 37
3.2.2 Diseño de experimentos para suero sintético 37
3.2.3 Experimentos por lotes 39
3.2.4 Procesamiento de muestras 39
3.3 Resultados y Análisis Suero sintético 39

3.3.1 Modelo para producción de hidrógeno con suero sintético 45
3.3.2 Análisis de la relación entre las variables y la producción de biogás 48
3.3.2.1 Gráficos de cubo 48
3.3.2.2 Graficas 3D superficie de respuesta 51
3.3.2.3 Validación de modelo 55
3.4 Conclusiones y recomendaciones 58
3.4.1 Conclusiones 58

4. Producción de hidrógeno con *Rhodobacter capsulatus cepa IR3::LacZ* en suero de leche industrial 61
4.1 Introducción 62
4.2 Materiales y Métodos 63
4.2.1 Microorganismo y medio 63
4.2.2 Suero de Leche y Pretratamiento 63
4.2.2.1 Reducción de contenido graso 64
4.2.2.2 Desproteinización 64
4.2.2.3 Pasteurización 64
4.2.3 Experimentos por lotes 66
4.2.4 Diseño de experimentos con suero de leche industrial 66
4.2.5 Procesamiento de muestras 67
4.3 Resultados y Análisis Suero de leche industrial 68
4.3.1 Análisis Estadístico 70
4.3.1.1 Graficas 3D superficie de respuesta modelo Suero Industrial 71
4.3.1.2 Validación del modelo 73
4.4 Evaluación de etapa de homofermentación 75
4.4.1 Materiales y métodos 75
• Procesamiento de muestras 76
4.4.2 Resultados 76
4.4.3 Fotofermentación 77
4.5 Conclusiones y recomendaciones 80
4.5.1 Conclusiones 80

5. Estudio de la cinética de producción de hidrógeno 81
5.1 Introducción 82
5.1.1 Fotofermentación 82
5.1.2 Fermentación oscura 83
5.1.3 Proceso integrado 84
5.2 Métodos y Materiales 85
5.2.1 Microorganismo y medio 85
5.2.2 Suero de Leche 85
5.2.3 Experimentos por lotes 85
5.2.4 Procesamiento de muestras 87
5.3 Resultados y Análisis 87
5.3.1 Producción de biogás 87
5.3.2 Perfiles cinéticos 89
5.4 Conclusiones 98

6. Conclusiones generales y recomendaciones 100
6.1 Conclusiones 100
6.2 Recomendaciones 101
6.2.1 Suero sintético 101

6.2.2 Suero Industrial.....101
6.2.3 Proceso de escalado 101

7. Bibliografía 103

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1 Contenido de energía en diferentes combustibles *[10] 6
Figura 1-2 Procesamiento de combustible sólido, líquido y gaseoso para la producción de hidrógeno. 7
Figura 1-3 Proceso Integrado de Producción de hidrógeno [99,115,142,143]. 15
Figura 2-1 Reactores de 125 ml (Fotografía) 27
Figura 2-2 Esquema de la cámara de reacción 28
Figura 2-3 Fotografía del sistema de seguimiento producción de H_2 (Fotografía) 28
Figura 2-4 Fotografía del sensor de CO_2 30
Figura 3-1 Gráficas de Cubo suero sintético *Rhodobacter capsulatus* cepa B10::LacZ ... 49
Figura 3-2 Gráficas de Cubo suero sintético *Rhodobacter capsulatus* cepa IR3::LacZ ... 50
Figura 3-3 Gráficos 3D Superficie de Respuesta suero sintético - *Rhodobacter capsulatus* cepa B10::LacZ 52
Figura 3-4 Gráficos 3D Superficie de Respuesta suero sintético - *Rhodobacter capsulatus* cepa IR3::LacZ 54
Figura 4-1 Pretratamiento para el suero de leche 65
Figura 4-2 Gráficos 3D Superficie de respuesta para modelo suero de leche Industrial .. 72
Figura 4-3 Perfil de producción de lactato para las pruebas de homofermentación. 76
Figura 4-4 Metodología de pretratamiento suero con adición de la etapa de homofermentación 79
Figura 5-1 Bioquímica del proceso de producción de hidrógeno mediante fotosíntesis *Adaptado de [30] 83
Figura 5-2 Reactor de 2 L utilizado en los experimentos de escalado 86
Figura 5-3 Perfil cinético Reactor suero sintético 1.5 L sin control de pH *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ con solución de Kolthoff 90
Figura 5-4 Gráficos reactor 1.5 L suero sintético sin control de pH. *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ con Solución Fosfato 92
Figura 5-5 Gráficos reactor suero sintético 1.5 L con control de pH. *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ con Solución Fosfato 94
Figura 5-6 Gráficos reactor suero industrial 1 L con control de pH. *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ con Solución Fosfato 96

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1. Métodos de producción de hidrógeno 8
Tabla 1-2. Comparación entre Nitrogenasa e Hidrogenasa 10
Tabla 1-3 Rendimientos de producción de hidrógeno mediante fotofermentación y procesos integrados 16
Tabla 1-4 Composición general del Suero de Leche 19
Tabla 1-5 Procesos de valorización del suero de leche 21
Tabla 2-1 Relación de peso seco y Absorbancia 26
Tabla 3-1 Matriz de Experimentos suero sintético 38
Tabla 3-2 Resultados suero sintético *Rhodobacter capsulatus* B10::LacZ (Fosfato) 40
Tabla 3-3 Resultados suero sintético *Rhodobacter capsulatus* B10::LacZ (Kolthoff) 41
Tabla 3-4 Resultados suero sintético *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ (Fosfato) 42
Tabla 3-5 Resultados suero sintético *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ (Kolthoff) 43
Tabla 3-6 Intervalo de respuesta para experimentos con suero sintético - *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ y B10::LacZ 44
Tabla 3-7 Análisis ANOVA de los modelos con suero sintético *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ y B10::LacZ 47
Tabla 3-8 Puntos de validación de los modelos obtenidos con suero sintético 55
Tabla 3-9 Resultados de la validación de los modelos obtenidos para el suero sintético 55
Tabla 4-1 Composición del lactosuero de trabajo 63
Tabla 4-2 Matriz de Experimentos para suero de leche industrial 67
Tabla 4-3 Resultados Suero Industrial *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ (Kolthoff) 68
Tabla 4-4 Resultados Suero Industrial *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ (Fosfato) 69
Tabla 4-5 Máximos y mínimos de las variables estudiadas - Suero de leche industrial *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ 69
Tabla 4-6 Análisis ANOVA Suero industrial - *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ (Fosfato) 71
Tabla 4-7 Puntos de validación para el modelo Suero industrial 73
Tabla 4-8 Resultados experimentales en puntos de validación para suero industrial 74
Tabla 4-9 Experimentos para comparación entre suero industrial con y sin pretratamiento de homofermentación. *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ 77
Tabla 4-10 Resultados pruebas con suero industrial con pretratamiento homofermentación *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ 77
Tabla 5-1 Condiciones de los experimentos reactor escalado. 86
Tabla 5-2 Resultados generales Suero sintético. *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ 87
Tabla 5-3 Resultados generales Suero industrial. *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ ... 89

Introducción

La sobreexplotación de los recursos naturales y la generación excesiva de basura son graves problemáticas ambientales que golpean al planeta y afectan directamente la calidad de vida de las personas [1]. Por esta razón la búsqueda de tecnologías que sean ambientalmente amigables es una prioridad. Una de las áreas que tiene más impacto en el planeta es el área energética, las tecnologías utilizadas actualmente para el uso, distribución y generación de energía en su mayoría no son ambientalmente sostenibles.
Uno de los problemas más relevantes de estas tecnologías es la generación de gases de efecto invernadero los cuales, son una de las principales causas de la contaminación ambiental. Estos gases no solo pueden causar complicaciones en la salud, además potencian y aceleran el cambio climático [2–4]. Por lo anterior se están haciendo esfuerzos a nivel mundial para reducir la emisión de este tipo de gases, un claro ejemplo de esto es la Conferencia de las Partes de la UNFCCC (Convención Marco de Naciones Unidas sobre el Cambio Climático) que en diciembre de 2015 creó el acuerdo de París. Este establece medidas y nuevos compromisos sobre la emisión de gases de efecto invernadero para limitar el calentamiento global a un promedio no mayor a 2 °C, lo que necesariamente conlleva a una transformación en el sector energético para reducir drásticamente las emisiones [5,6].

El dióxido de carbono es el gas de efecto invernadero más notorio y en gran porcentaje es producido por el uso de combustibles fósiles para la generación de energía. Para el 2013 las emisiones de CO_2 estuvieron cerca de los 30 mil millones de toneladas métricas, siendo las principales fuentes carbón, gas natural y combustibles líquidos. Para el 2050 se podría esperar que este valor se duplique si no se implementan cambios sustanciales [7]. Además, del nocivo efecto ambiental que los combustibles fósiles tienen es también relevante la creciente demanda energética que en un futuro puede no ser cubierta debido a la escasez de estos recursos y su inestabilidad en la oferta y demanda, lo cual conlleva a graves problemáticas de carácter económico y social [8].

Por lo anterior, la industria y los gobiernos de diferentes países están invirtiendo en investigación y desarrollo de nuevas tecnologías que reduzcan el impacto en el medio ambiente, mejorando los procesos, minimizando los costos y optimizando el uso de

recursos [7,9]. La generación de fuentes de energía renovables y eficientes es uno de los puntos clave de esta revolución energética.

Es en este punto donde el hidrógeno y su uso como fuente de energía se convierte en una alternativa de gran interés, pues es una tecnología energética ambientalmente amigable. El hidrógeno posee un rendimiento energético (143 kJ g^{-1}) cerca de tres veces mayor al de los hidrocarburos [10,11], además su uso como combustible no produce gases de efecto invernadero que generen un alto impacto ambiental (sólo vapor de agua). Además, se puede transformar el hidrógeno en electricidad, trabajo mecánico o calor, mediante pilas combustibles (*fuel cells*), motores de combustión interna y quemadores de hidrógeno, respectivamente [12–15]. Así, una vez estén más desarrolladas las tecnologías del hidrógeno su aplicación podrá ayudar a flexibilizar el sistema energético mundial [5,16].

Si bien el hidrógeno es un portador de energía importante, aún no se puede considerar una fuente de energía viable pues a pesar de encontrarse de forma abundante en el ambiente, para generar hidrógeno con alto grado de pureza que pueda ser utilizado como fuente de energía se requiere la aplicación de procesos en los que hay que invertir grandes cantidades de energía [17]. El hidrógeno puro puede ser obtenido de fuentes primarias como combustibles fósiles (gas y carbón) o fuentes renovables como biomasa, así mismo puede obtenerse de fuentes secundarias como electricidad por ejemplo mediante la electrólisis del agua [17,18]. Los métodos que se utilizan para producirlo en la actualidad como el reformado con vapor, la gasificación y la electrólisis del agua, requieren altos gastos energéticos [2,9,19] y no alcanzarían a suplir las necesidades mundiales de hidrógeno si se pensara utilizar como fuente de energía. Más del 90% del hidrógeno producido a nivel mundial depende de combustibles fósiles en alguna parte del proceso [19]. Esto hace que no sea una fuente energética ambientalmente amigable pues hay un proceso de contaminación en su producción. Por otra parte, el costo de su producción está directamente ligado con el precio de estos combustibles fósiles.

El consumo del hidrógeno en la actualidad se concentra principalmente en la industria de fabricación de fertilizantes, en la producción de metanol y en la refinación de combustibles. Adicionalmente, crece el interés por su uso como fuente de energía. Según la Agencia Internacional de Energía (IEA por sus siglas en inglés), el hidrógeno tiene el potencial para utilizarse en una variedad de aplicaciones, desde uso doméstico hasta industrial; por esta

razón, países como Brasil, Alemania, Japón, entre otros pertenecientes a la IEA, tienen como prioridad en su estrategia de desarrollo energético al hidrógeno [20]. Una prueba de esto es el uso de tecnologías de hidrógeno en los sistemas de transporte público. Como ejemplos notables entre otros están las flotas de buses de hidrógeno en Londres, Madrid, Barcelona, y la primera iniciativa latinoamericana, un prototipo en Sao Paulo [21]. Se espera que para 2020 varias ciudades latinoamericanas hayan reemplazado aproximadamente 40000 vehículos de transporte público con tecnología de baja generación de dióxido de carbono, para lo cual se está considerando el uso de hidrógeno. Entre las principales ciudades están: Buenos Aires, Bogotá, Caracas, Ciudad de México, Quito y Río de Janeiro [22,23]. Por otra parte también se han adaptado pilas combustibles de hidrógeno en prototipos de dispositivos móviles como en los celulares y en sistemas de calefacción y refrigeración para el hogar [24].

Establecido el potencial del hidrógeno en el futuro panorama energético mundial es necesario encontrar formas de producción de hidrógeno más eficientes y menos contaminantes. Actualmente se está incursionando en la investigación de nuevos métodos y procesos entre los cuales han ganado importancia, los métodos biológicos. Este tipo de procesos presentan una ventaja importante frente a los procesos tradicionales pues es posible utilizar diversos sustratos como aguas residuales y residuos orgánicos, además se tiene un gasto energético mucho menor ya que las condiciones del proceso (temperatura y presión) son casi las ambientales. Sin embargo, la eficiencia y rendimiento de estos procesos son bajos [2,11,25].

Entre los métodos biológicos que se pueden utilizar se encuentran la biofotólisis directa e indirecta, la fotofermentación y la fermentación oscura [25–27]. Con el fin de incrementar la eficiencia de los procesos biológicos de producción de hidrógeno se pretende hacer la integración de todos estos métodos para poder aprovechar los sustratos elegidos en mayor porcentaje [15,28,29]. Sin embargo, es necesario el estudio de cada proceso por separado para entender los factores más relevantes y poder optimizar cada etapa del proceso. En este trabajo se estudió la fotofermentación y los factores que favorecen la producción de hidrógeno en el mismo.

Una de las características más relevantes del proceso de fotofermentación es la capacidad de utilizar ácidos orgánicos como sustrato [2,27,30,31]. Teniendo en cuenta esto se

presenta la posibilidad de dar valor agregado a un residuo de la industria colombiana como es el suero de leche. El suero de leche o lactosuero es un líquido obtenido en el proceso de fabricación del queso el cual contiene una alta carga orgánica principalmente debido a la presencia de lactosa, ácido láctico y proteínas [32,33] (DBO>30g L^{-1}) y por lo tanto debe ser tratado adecuadamente para su disposición final o podría generar grandes daños ambientales [34,35]. En Colombia para el 2012 se produjeron aproximadamente 580 mil toneladas de suero de leche y sólo 18% de éste es tratado adecuadamente[36]. Al ser un residuo generado en alta cantidad y con un alto poder contaminante se hace necesario hallar un método para su aprovechamiento o tratamiento [35,37].

Teniendo en cuenta lo anterior, en este proyecto se busca desarrollar un método para la valorización del suero lácteo mediante su aprovechamiento como sustrato en la producción biológica de hidrógeno utilizando la bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus*. La transformación en hidrógeno del suero de leche representa una diversificación de la producción energética y una oportunidad de valorización financiera. Aunque este proyecto evalúa únicamente la producción de hidrógeno a escala laboratorio, los resultados obtenidos hasta el momento reflejan el potencial que este proceso tiene [38].

1. Generalidades de la investigación

Esta investigación es parte de un proyecto macro que busca optimizar la producción biológica de hidrógeno mediante el uso de sustancias residuales o subproductos de la industria. Particularmente, se trabajó con el suero de leche como medio de cultivo para la producción de hidrógeno mediante fotofermentación utilizando la bacteria *Rhodobacter capsulatus* cepas recombinadas B10::LacZ e IR3::LacZ. En este primer capítulo se hace una contextualización de las tecnologías de producción de hidrógeno, comparando los métodos convencionales con los métodos biológicos y explicando a manera general los principios biológicos de la producción de hidrógeno. Posteriormente, se hace una descripción general de los microorganismos y el sustrato utilizados en el proyecto y estudios previos realizados con los mismos. Finalmente, se establecen los objetivos generales y específicos de la tesis.

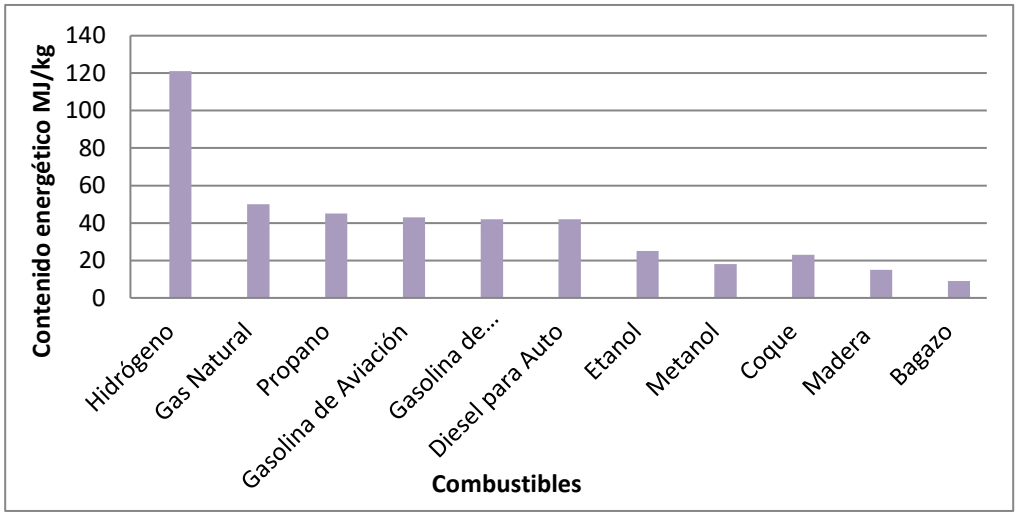
The doctoral thesis is part of a macroproject whose objective is to optimize the biological production of hydrogen using as substrate residues or by-products of the industry. In this case, cheese whey was use as a culture medium for the hydrogen production by photofermentation using the bacteria *Rhodobacter capsulatus* recombinant strains B10::LacZ and IR3::LacZ. The first chapter exposes hydrogen production technologies, comparing conventional and biological methods, explaining in a general basis the biological principles of hydrogen production. Then, a general description of the microorganisms and the substrate used in the project is made showing previous studies. Finally, the general and specific objectives of the thesis are established.

1.1 Marco Teórico

El hidrógeno H_2 es una molécula que tiene una alta densidad energética en comparación con otros combustibles (Figura 1-1); adicionalmente, al ser utilizada como fuente de energía no hay producción de dióxido de carbono. Por estas razones el hidrógeno se ha convertido en un protagonista importante del panorama energético mundial y se realizan

esfuerzos para mejorar los procesos para su producción, almacenamiento, transporte y uso [2,13,19,39].

Figura 1-1 Contenido de energía en diferentes combustibles *[10]



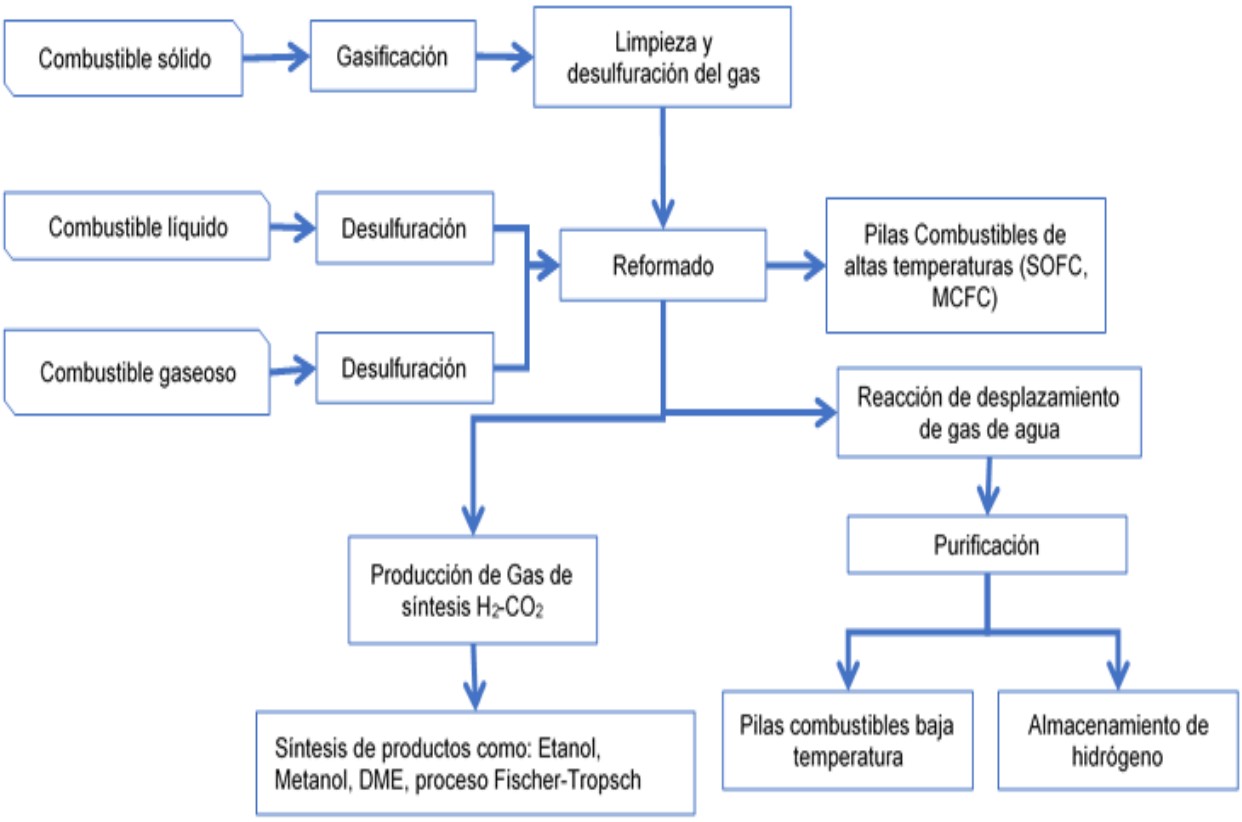
1.1.1 Producción de Hidrógeno

Actualmente para la producción de hidrógeno se utilizan principalmente como materias primas gas natural, aceites, carbón, agua y biomasa [17,40].

En la Figura 1-2 (Tomada de [41]) se puede observar un esquema de los métodos convencionales utilizados para la producción de hidrógeno según el estado de la materia prima inicial (líquida, sólida o gaseosa). Además, esta gráfica muestra los usos actuales y potenciales del hidrógeno: como fuente de energía directamente en pilas combustibles, en la producción de gasolina, metanol, etanol y otros productos químicos de alto valor agregado.

Además de los métodos convencionales de producción de H_2 existen los procesos biológicos, los cuales se expondrán con más detalle posteriormente. Estos procesos tienen gran potencial pues disminuyen los costos de la producción de hidrógeno referentes a materia prima y energía [18,40]. Sin embargo, actualmente no tienen alto rendimiento por lo que se están desarrollando diferentes tecnologías con microorganismos modificados y recombinados genéticamente, entre otras alternativas. Otros esfuerzos que se está haciendo son en el área de optimización del diseño de biorreactores de acuerdo a las necesidades de los microorganismos, lo cual junto con la selección de las mejores condiciones de operación aumenta el rendimiento notablemente [18,26,40,42].

Figura 1-2 Procesamiento de combustible sólido, líquido y gaseoso para la producción de hidrógeno.



Para obtener una visión global y más clara de los diferentes procesos de producción de hidrógeno, sus ventajas, desventajas y perspectivas se presenta a continuación la Tabla 1-1. En esta tabla se puede observar como las condiciones de operación, en este caso específicamente la temperatura, son mucho mayores para los procesos convencionales lo cual supone un mayor gasto energético. Por otro lado, los métodos biológicos tienen menores temperaturas de operación, pero mucho menores rendimientos también.

Para poder mejorar los procesos biológicos de producción de hidrógeno es importante entender en qué consisten, cuáles son los factores importantes y como alterar el metabolismo de los microrganismos que participan para obtener los resultados deseados. Los conceptos básicos son expuestos a continuación.

Tabla 1-1. Métodos de producción de hidrógeno

Tecnología	Eficiencia	Temperatura de Operación	Referencia
Reformado de etanol con vapor	67%	550-750 °C	[42,43]
Reformado de metanol con vapor	70%	700-1000°C	[18,43]
Gasificación de carbón	60%	1100-1600°C	[42,43]
Gasificación de biomasa	45-50%	100-500°C	[17,43]
Electrólisis de agua	56-73%	Electrolizador óxido sólido: 500-800°C	[17,18,42]
		Electrolizador PEM: 80-100°C	[17,18,42]
		Electrolizador alcalino: 100-150°C	[17,18,42]
Producción Fotobiológica	<10%	25-40°C *	[2,17,26]
Producción Fermentativa	<10%	25-40°C *	[2,17,26]

*Hasta 80°C Para bacterias hipertermofílicas [44–46].

1.1.2 Producción biológica de hidrógeno

Es necesario conocer los mecanismos moleculares de la producción de hidrógeno para realizar investigación aplicada sobre el uso del suero de leche como sustrato en la producción con microorganismos, que debido a su metabolismo pueden ser utilizados para el aprovechamiento de sustancias residuales.

Entre los sustratos más utilizados están el almidón, la celulosa contenida en residuos de la industria de alimentos o agricultura, aguas residuales ricas en carbohidratos como el suero de leche, o residuos de la industria panadera o cervecera y residuos de plantas de tratamientos de aguas, entre otros [2].

Para todos los métodos de producción biológica de hidrógeno, las enzimas hidrogenasa y nitrogenasa son fundamentales pues son estas las que catalizan la reducción de H^+ a hidrógeno en los diferentes microorganismos [39].

- **Hidrogenasa**

La hidrogenasa es una metaloproteína que está presente en casi todos los organismos procariotas, en algunos eucariotas anaerobios y en algas verdes unicelulares [39].

La gran mayoría de estas enzimas contienen un clúster de hierro-azufre y dos átomos metálicos en su centro activo, ya sea Ni o Fe, [NiFe]-hidrogenasa y [FeFe]-hidrogenasa, respectivamente. Estos dos tipos de enzimas están encargadas de catalizar la oxidación reversible del gas hidrógeno[47].

$$2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$$

La hidrogenasa juega un papel fundamental en el metabolismo energético microbiano. Además de su rol en la fermentación y la respiración la hidrogenasa puede interactuar con los sistemas de transporte de electrones unidos a la membrana a fin de mantener el equilibrio redox, particularmente en microorganismos fotosintéticos como las cianobaterias [48].

La [NiFe]-hidrogenasa es la más estudiada de estas enzimas en las bacterias y normalmente cataliza el proceso de captación de hidrógeno del medio y su separación, mientras que la [FeFe]-hidrogenasa es la encargada del proceso de producción de H_2. La reacción es reversible y depende del potencial redox de los componentes disponibles para interactuar con la enzima [49–51].

- **Nitrogenasa**

La nitrogenasa es un sistema compuesto por dos proteínas que cataliza la reducción de nitrógeno molecular N_2 en amonio, junto con la hidrólisis del ATP. La reacción general usualmente se representa así:

$$N_2 + 8H^+ + 16ATP + 8e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$$

Pi= Fosfato inorgánico

Cuatro clases de nitrogenasa se han identificado hasta la fecha, tres de las cuales son muy similares y se distinguen principalmente por la presencia de diferentes heterometales

(molibdeno, vanadio y hierro), entre estas enzimas la mejor estudiada es la Mo nitrogenasa de *Azotobacter vinelandii* [39,52,53].

La reacción catalizada por la nitrogenasa requiere energía, al menos dos moléculas de ATP por electrón. A concentraciones bajas de nitrógeno molecular, la enzima puede catalizar la reducción de protones para producir hidrógeno por lo cual los procesos de producción de hidrógeno con microorganismos que contienen esta enzima se realizan en ausencia de N_2 [49,54]. Adicionalmente, la nitrogenasa es muy sensible a la presencia de oxígeno, por lo que queda rápida e irreversiblemente inactivada por este [50,55].

En la **Tabla 1-2** se muestra la comparación de las principales características de la nitrogenasa y la hidrogenasa.

Tabla 1-2. Comparación entre Nitrogenasa e Hidrogenasa
(Adaptado de [50]).

Características	Hidrogenasa	Nitrogenasa
Producción de Hidrógeno	Si	Si
Consumo de Hidrógeno	Si	No
Requerimientos de Energía (ATP)	No	Si
Sensibilidad al Oxígeno	Si	Si
Sensibilidad al Hidrógeno	Si	No
Velocidad Catalítica	Alta	Baja
Presencia en Procariotas	Si	Si
Presencia en Eucariotas	Si	No

1.1.3 Métodos de producción biológica

Según el microorganismo utilizado para la producción de hidrógeno, la presencia de hidrogenasa y/o nitrogenasa y el metabolismo expresado (según las condiciones de cultivo), hay diferentes métodos de producción biológica que se pueden clasificar así:

- **Biofotólisis Directa**

La biofotólisis directa es un método de producción de hidrógeno catalizado por la enzima hidrogenasa. Se realiza en dos etapas: fotosíntesis y producción catalizada de hidrógeno. El microorganismo más común utilizado para este método es el alga verde [2,11,25,31,56].

Este foto-proceso de producción de hidrógeno es de interés ya que utiliza: agua y luz. En este proceso primero hay una etapa para el crecimiento de los microorganismos en estanques abiertos, luego se cosechan y se ubican en fotobiorreactores donde se busca que produzcan hidrógeno y oxígeno, sin crecimiento. Para lograr esto hay que adaptar las algas a una atmósfera anaeróbica, inyectando por ejemplo argón en oscuridad [18,19,49].

Fotosíntesis: $2H_2O \rightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$

Producción de Hidrógeno: $4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2$

Si bien este proceso de producción de hidrógeno parece simple, existen diversos factores que hay que tener en cuenta. El primero es que la mezcla de oxígeno e hidrógeno es inflamable, por este motivo su separación y manejo es difícil y costosa. Por otra parte, la hidrogenasa es altamente sensible al oxígeno y se ve inhibida por éste, lo cual baja notablemente el rendimiento del proceso. Las tasas de producción de hidrógeno reportadas para este método son del orden de 0.07 mmol $h^{-1}L^{-1}$ [49,57].

- **Biofotólisis Indirecta**

Al igual que en el proceso anterior, la producción de hidrógeno es catalizada por la enzima hidrogenasa. No obstante, los microorganismos que realizan este proceso también poseen la nitrogenasa por lo que, si se dan las condiciones adecuadas, se podría activar su mecanismo. Sin embargo, normalmente la producción está mediada únicamente por la hidrogenasa [30].

Las cianobacterias y algas verde-azules son las principales representantes de los microorganismos que producen hidrógeno mediante biofotólisis indirecta.
Estos microorganismos realizan fotosíntesis, mediante la cual el CO_2 es fijado a sustratos ricos en hidrógeno interno, generando hidrógeno molecular cuando éstos son incubados en condiciones anaerobias, como se muestra en las siguientes reacciones [18,31,58]

$$6H_2O + 6CO_2 \xrightarrow{Luz} C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

$$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \xrightarrow{Luz} 12H_2 + 6CO_2$$

Debido a que el proceso de fotosíntesis genera oxígeno y las enzimas se ven inhibidas por este, se intenta reducir la inhibición mediante una separación temporal de las reacciones en las que se produce hidrógeno y aquéllas en las que está presente el oxígeno. Al igual que en la biofotólisis directa, hay una etapa de crecimiento de los microorganismos en estanques abiertos, luego éstos se cosechan y se adicionan en un reactor anaeróbico donde se induce la hidrogenasa y se inactiva el proceso de fotosíntesis.

Como idealmente sólo se produce hidrógeno y dióxido de carbono mediante este proceso, el gas es más manejable y menos peligroso [49]. Las tasas de producción de hidrógeno utilizando este método son variadas y dependen de las especies de cianobacterias y las condiciones del proceso. Entre las desventajas se encuentran las bajas tasas de producción y la sensibilidad al O_2. En este método se ha reportado una producción de 0.355 mmol $h^{-1}L^{-1}$ para cepas mutantes de *Anabaena variabilis* [2,18,31,57].

- **Fotofermentación**

La fotofermentación es un proceso que cataliza la producción de hidrógeno mediante la enzima nitrogenasa. Los microorganismos más utilizados son las bacterias púrpuras no sulfurosas que en condiciones de deficiencia de N_2, utilizando luz como fuente de energía y compuestos como ácidos orgánicos como fuente de carbono, producen hidrógeno.
Estas bacterias no pueden hidrolizar el agua por sí mismas como en el caso de las algas, pero bajo condiciones anaeróbicas, pueden utilizar ácidos orgánicos como donadores de electrones.

$$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \xrightarrow{luz} 12H_2 + 6CO_2$$

Una ventaja importante de este proceso es que se pueden utilizar sustancias de desecho como sustrato [2,27,30,31].

Uno de los factores claves en la fotofermentación es la intensidad de luz, ya que se ha observado que afecta tanto la velocidad como el rendimiento de producción de hidrógeno debido a que la nitrogenasa requiere energía que obtiene de la fotosíntesis anoxigénica que realizan los microorganismos [59,60].

Las bacterias más utilizadas son del género *Rhodobacter sp.* Los estudios realizados comúnmente utilizan producción por lotes; sin embargo algunos usan reactores en continuo [2,61–66]. Los resultados más destacables de tasas de producción de hidrógeno varían entre de 9 mol H_2 mol^{-1}de glucosa y 145 mmol $h^{-1}L^{-1}$ [57,67–69].

Entre las ventajas de este método están: el uso de diferentes materiales de desecho como sustrato, aprovechamiento de un amplio espectro de energía lumínica por parte de los microorganismos, debido a los pigmentos fotosintéticos presentes en la bacteria [70] y ausencia de producción de oxígeno en el proceso lo cual evita los problemas de inhibición de las enzimas. La principal desventaja es la baja eficiencia comparada con los procesos convencionales de producción (tabla 1-1), sin embargo se están realizando esfuerzo para mejorarla [25–27,71,72].

- **Fermentación oscura**

La producción de hidrógeno por este método es realizada por bacterias anaeróbicas que crecen en oscuridad y usan sustratos ricos en carbohidratos. Entre estos se encuentran los del género *Clostridium* como son *C. buytricum, C. thermolactium,* y *C. pasteurianum* [2,25].

La mayoría de la producción de hidrógeno está guiada por el metabolismo anaeróbico del piruvato formado durante el catabolismo de varios sustratos. Los subproductos de la fermentación oscura pueden ser ácido acético y butírico y los rendimientos prácticos de hidrógeno en la fermentación oscura son de 4 mol H_2 mol^{-1} glucosa cuando el único producto final es ácido acético y 2 mol H_2 mol^{-1} glucosa cuando el producto final es butirato [18,31,73–75].

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 4H_2 + 2CO_2$$
$$7C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \rightarrow 6CH_3CH_2CH_2COOH + 24H_2 + 18CO_2$$

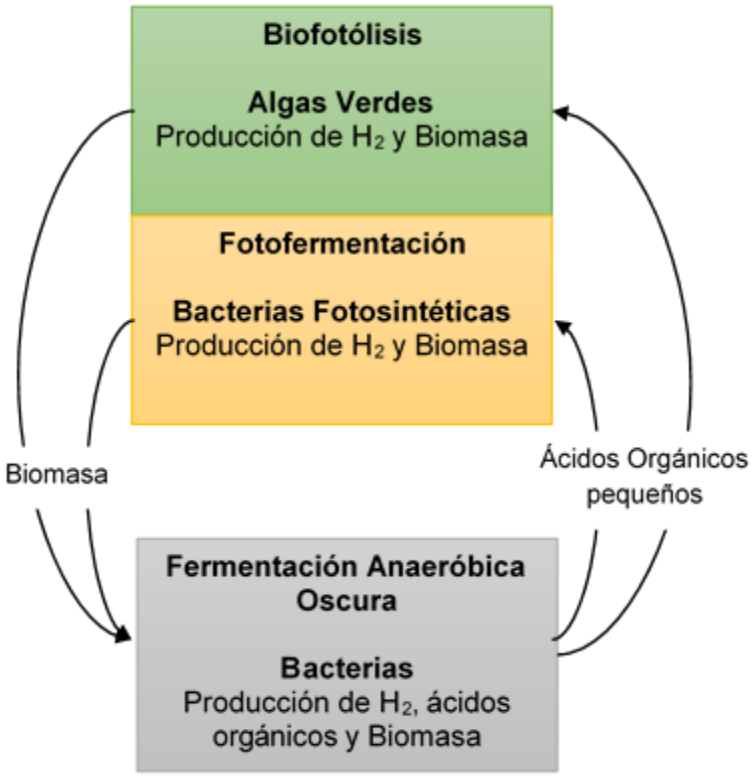
La principal ventaja de este método es que se pueden utilizar varias fuentes de carbono como sustrato, incluyendo sustancias de desecho. Las desventajas consisten en sus bajos rendimientos pues puede haber formación de otros productos como diferentes ácidos orgánicos (como ácido láctico) o alcoholes (como etanol), lo que reduce los rendimientos y hace necesario un muy buen control de las condiciones de fermentación para evitar al máximo su formación. Se reportan producción del orden de 77 mmol $h^{-1}L^{-1}$ [18,25,26,57,74,76].

- **Producción integrada**

Según las características de los métodos expuestos anteriormente para la producción de H_2 y con el fin de optimizar el uso de los sustratos, actualmente se trabaja en diseñar un sistema integrado. En este proceso se busca que el hidrógeno sea producido a través de un ciclo de luz-oscuridad. Una etapa del ciclo consiste en extraer la biomasa de procesos como biofotólisis o fotofermentación y convertirla mediante procesos enzimáticos, en material celulolítico compuesto por hidrolizados de proteínas y poliglucosa, con el que se puede alimentar directamente a las bacterias anaeróbicas que se utilizan en la fermentación oscura. Además, existen estudios que han demostrado que para la producción de hidrógeno mediante fermentación oscura se puede utilizar biomasa de algas, aguas residuales de la industria ricas en carbohidratos como suero de leche, lodos generados en plantas de tratamiento de aguas y desechos de la industria alimentaria ricos en almidones o celulosa como cascaras de papa [15,28,29,77]. En la otra etapa del ciclo, el proceso de fermentación oscura anaeróbica mediante bacterias genera H_2 y una variedad de ácidos orgánicos. Estos ácidos pueden ser utilizados para alimentar los procesos de producción fotosintética de H_2 como se muestra en la figura 1-3.

Este sistema integrado hasta el momento ha generado mejoras en los rendimientos (tabla 1-3) por lo cual el proceso se acerca mucho más a ser sostenible, y económicamente viable para la producción de H_2. Sin embargo, aún es necesario desarrollar un trabajo intenso de investigación en cada una de las etapas del proceso para así poder maximizar la producción de hidrógeno y obtener rendimientos y productividades mucho mayores que permitan pensar en un escalado a nivel industrial [25,78]. Para esta tesis, se estudia la etapa de fotofermentación en búsqueda de mejorar la productividad y rendimientos de la misma.

Figura 1-3 Proceso Integrado de Producción de hidrógeno [99,115,142,143].



En la Tabla 1-3 se muestran los resultados de diversos estudios sobre diferentes métodos de producción biológica de hidrógeno, específicamente sobre los procesos de fotofermentación, fermentación oscura y producción integrada. Los sustratos son de diferente naturaleza ya sea carbohidratos puros o residuos industriales. Como se puede observar las mayores productividades se obtuvieron para los experimentos de fermentación oscura, y además la productividad mejora al realizar los experimentos en continuo. Sin embargo, al observar los rendimientos producto sustrato es evidente que los procesos de producción integrada son los que obtienen valores más elevados, lo cual indica un aprovechamiento mayor del sustrato.

Tabla 1-3 Rendimientos de producción de hidrógeno mediante fotofermentación y procesos integrados

Organismo	Sustrato	Proceso	Yp/s mol H_2 mol^{-1} sustrato	Productividad H_2 (ml H_2 L^{-1} h^{-1})	Ref.
R. sphaeroides OU 001	Efluente de refinería de azúcar+ ácido málico	Fotofermentación Por lotes	0.6	27.24	[79]
R. sphaeroides OU 001	Agua residual de aceite de oliva	Fotofermentación Por lotes	0.011[a]	3.1	[80]
R. capsulatus B10	Ácido láctico 120 mM	Fotofermentación Por lotes	3.1	45	[81]
R. sphaeroides OU 001	Efluente de refinería de azúcar al 20%	Fotofermentación Por lotes	0.419	5	[79]
R. sphaeroides	Ácido málico 4g L^{-1}	Fotofermentación Por lotes	6.6	37	[82]
R. marinum (Sanur)	Agua residual de salsa soya + extracto de levadura	Fotofermentación Por lotes	2.14	38.14	[83]
Lactobacillus amylovorus / Rhodobium marinum	Biomasa de alga (Almidón)	Fermentación oscura y fotofermentación secuencial	7.2	55.3	[84]
C. acetobutylicum DSM 792 / R. sphaeroides OU 001	Almidón	Fermentación oscura y fotofermentación combinada	2.62	12.24	[85]
C. buytricum, E. aerogenes, Rhodobacter sp. M-19	Residuo de almidón de camote*.	Fermentación oscura y fotofermentación secuencial	7 (sustrato: glucosa)	31.5	[86]
C. buytricum, Rhodobactersp. M-19	Almidón de camote*	Fermentación oscura y fotofermentación combinada	6.6 (sustrato: glucosa)	22.1	[87]

a. Expresado en mmol H_2 mg^{-1} carbohidratos.

1.1.4 Producción fotofermentativa de hidrógeno utilizando suero de leche como sustrato

Como se explicó con anterioridad el objetivo de esta investigación es desarrollar un proceso de producción fotofermentativa de hidrógeno utilizando un residuo de la industria

láctea como sustrato. A continuación, se describen las bacterias utilizadas para este propósito y el sustrato seleccionado, así como los antecedentes de su uso en producción de biocombustibles.

1.1.4.1 Bacterias púrpuras no sulfurosas

La bacteria que se va a utilizar para la producción de hidrógeno es *Rhodobacter capsulatus*, una bacteria purpura no sulfurosa (BPNS).

Las BPNS constituyen un grupo de microorganismos que pueden crecer bajo diversas condiciones variando su metabolismo. Esta versatilidad hace que las BPNS se consideren promisorias para la producción de hidrógeno debido a que tienen un alto rendimiento de conversión del sustrato y además pueden consumir sustratos orgánicos derivados de desechos industriales lo cual supone menores gastos en materias primas y además ayuda a procesos de biorremediación ambiental [2,27,88].

Estos organismos se adaptan al entorno cambiando entre los diferentes mecanismos metabólicos según: el grado de anaerobiosis, disponibilidad de fuentes de carbono, disponibilidad de fuente lumínica, entre otros [27,50].

De esta forma las bacterias se pueden comportar como:

- Fotoheterotrofas: utilizando la luz como fuente de energía y compuestos orgánicos como fuente de carbono.
- Fotoautotrofas: utilizando la luz como fuente de energía y el CO_2 como fuente de carbono.
- Quimioheterotrofas: utilizando compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía.

Estás bacterias realizan fotosíntesis anoxigénica, es decir durante el proceso de fotosíntesis no se produce oxígeno, lo cual es una condición ideal. Además, el biogás producido está compuesto únicamente por hidrógeno y dióxido de carbono, este último en una concentración inferior o igual al 25% por lo cual este biogás se puede manejar más fácil y puede ser alimentado directamente en una pila combustible para la generación de energía [14].

Como se mencionó anteriormente, el proceso de producción de hidrógeno requiere de energía que se obtiene de la luz, por tanto, es importante la capacidad de aprovechamiento de la misma por parte de los microorganismos. Las BPNS poseen bacterioclorofila y

carotenos los cuales pueden absorber un intervalo amplio de longitudes de onda de la luz haciendo los procesos más eficientes. Estos pigmentos son los que le confieren color púrpura o rojizo a estas bacterias [30,50,89].

Existen varias especies de bacterias BPNS que se ha investigado en la producción de hidrógeno mediante fotofermentación entre las cuales están: *Rhodobacter sphaeroides* O.U 001 [67,79,90,91], *Rhodobacter sphaeroides*[80,92,93], *Rhodobacter capsulatus* [38,94–96], *Rhodopseudomas palustris* [97], *Rhodospirillum rubrum,* entre otras [61,62].

Si bien el estudio de la producción de hidrógeno mediante las bacterias de la especie *Rhodobacter sp.* no es un tema nuevo, aún queda mucho que mejorar pues los rendimientos del proceso son bajos. Los esfuerzos que se han realizado hasta ahora, han llevado a un mejor entendimiento de los metabolismos y reacciones que participan en la producción de hidrógeno y son el punto de partida para nuevas investigaciones que permitan mejorar la eficiencia de los procesos de producción biológica [17,18,27,50]. Actualmente con este fin se trabaja en el mejoramiento de cepas mediante ingeniería metabólica, diseños de reactores y optimización de condiciones.[72]

1.1.4.2 Suero de leche

El lactosuero, es un líquido principalmente blanco que puede tener tenue tonalidad verde-amarilla la cual es originada por la presencia de riboflavina [33]. El suero de leche contiene cerca del 50% de los nutrientes de la leche y una alta proporción de proteínas hidrosolubles. Entre sus componentes más importantes está la lactosa la cual constituye la principal facción de la carga orgánica del suero y equivale al 95% de lactosa de la leche es decir 39-60 g L^{-1}. Además, contiene el 25% de las proteínas (6-8 g L^{-1}) y el 8% de la materia grasa (4-5 g L^{-1}) presente en la leche y sales y minerales (8-10% extracto seco) [98].

Sus DBO y DQO se encuentran respectivamente entre 27-60 g L^{-1} y 50-102 g L^{-1}, y ya que el índice de biodegradabilidad (DBO_5/DQO) es comúnmente mayor a 0.5 este sustrato es susceptible a degradación por tratamiento biológico. Los componentes inorgánicos del suero son principalmente sales minerales como cloruro de sodio, cloruro de potasio y sales de calcio especialmente fosfatos [99,100].

En general la composición del lactosuero varía dependiendo del origen de la leche y el tipo de queso elaborado. Sin embargo, se clasifica principalmente en: suero ácido y dulce (Tabla 4-1 [33,99,101]). El suero dulce se produce comúnmente mediante el uso de quimosina (comúnmente conocido como cuajo) u otras enzimas que se utilizan para llevar a cabo el proceso de coagulación, la proteólisis de la caseína de la leche produce queso con paracaseinato de calcio y suero que contiene macropéptidos de caseína (CMP).

Tabla 1-4 Composición general del Suero de Leche

Componente	Suero Dulce ($g\ L^{-1}$)	Suero Ácido ($g\ L^{-1}$)
Sólidos totales	63.0-70.0	63.0-70.0
Lactosa	46.0-52.0	44.0-46.0
Proteína	6.0-10.0	6.0-8.0
Calcio	0.4-0.6	1.2-1.6
Fosfato	1.0-3.0	2.0-4.5
Lactato	2.0	6.4
Cloruros	1.1	1.1
pH	> 6,0	> 5.0
Densidad ($g\ cm^{-3}$)	1,025	1,024

El lactosuero ácido se produce al acidificar la leche hasta el punto isoeléctrico de la caseína (pI=4.6). La precipitación de caseína libera altas concentraciones del ion calcio al suero que se produce. El suero ácido es altamente mineralizado pues tiene aproximadamente el 80% de los minerales de la leche de partida, adicionalmente el ácido láctico presente forma una interacción con el calcio separándolo del complejo de paracaseinato de calcio y formando lactato de calcio. Por tanto, el suero ácido normalmente contiene una menor proporción de proteínas y mayor nivel de cenizas. Adicionalmente el suero ácido no contiene CMP [100,102].

La solubilidad de las proteínas en el lactosuero está sujeta a cambios en la temperatura y en el pH, los cuales pueden llevar a la desnaturalización y posterior agregación de la misma [103,104]. La desnaturalización implica la alteración de la estructura de la proteína. Debido a cambios en el medio, la proteína pierde su estructura tridimensional lo cual permite que se formen interacciones de entrecruzamiento entre las moléculas de proteínas como las siguientes: hidrófobas proteína-proteína, electrostáticas, enlaces de hidrógeno y disulfuro-sulfhidrilo. Estas interacciones resultan en agregación, coagulación y finalmente precipitación [105]. En el caso de la α-lactoalbumina se sabe que a pH mayores a 9.0 o

menores de 4.0 hay una disociación del ion Ca^{2+} lo cual desestabiliza la configuración de la molécula y conlleva a la desnaturalización. Otra forma para que se lleve a cabo la desnaturalización de las proteínas es mediante cambios en la temperatura ya que esta afecta los enlaces no covalentes que estabilizan las estructuras terciarias y secundarias [105,106]. Sin embargo, la desnaturalización no es suficiente para que las proteínas pierdan la solubilidad en el medio y se precipiten. Para conseguir esto es necesario que se lleve un proceso de agregación de las proteínas el cual está fuertemente influenciado por el pH. En el punto isoeléctrico de una proteína la carga neta es cero, las fuerzas electroestáticas de repulsión son mínimas y la agregación se da más fácilmente. Entre más se aleje el pH del punto isoeléctrico mayores son las fuerzas de repulsión y menor la probabilidad de agregación [105]. El punto isoeléctrico de la α-lactoalbumina se da a pH 4.2 -4.8 mientras que para la β-lactoglobulina se encuentra entre 4.6 y 5.2 [107,108].

De acuerdo con la Comisión europea de estadísticas [109], para 2015 la cantidad de productos lácteos generados en Europa fue alrededor de 114 millones de toneladas, que incluyen leche (27.5%), queso (8.3%), mantequilla (2.0%) y suero (43.6%). En Europa, Francia es el primer productor de queso con una producción anual de 1.95 millones de toneladas, mientras que en América del sur la producción de queso con leche de vaca para el año 2014 fue de 1.1 millones de toneladas, siendo Colombia el sexto país de la región en producción con 58.500 toneladas en el 2014 [37].

Como un subproducto del proceso de fabricación del queso se genera el lactosuero. Por regla general por cada kilogramo de queso se producen 9 kg de suero de leche, con este supuesto la producción de suero de leche para Francia y Colombia seria respectivamente 17.5 millones de toneladas y 526.500 toneladas al año, lo que muestra que el suero de leche es uno de los residuos más producidos por la industria láctea.

En el pasado, el suero de leche se disponía sin ningún pretratamiento directamente en el ambiente ya fuera en suelos o diferentes cuerpos de agua como ríos, lagos o el océano [99]. Debido al daño generado en el ambiente, actualmente se contemplan otras opciones para disponer de este residuo de las cuales resaltan principalmente tres.

La primera se basa en la aplicación de tecnologías de valorización que buscan recuperar componentes valiosos del suero, como son la lactosa y las proteínas [110]. La segunda opción consiste en la aplicación de tratamientos biológicos, los cuales pueden ser considerados a su vez tecnologías de valorización. En esta opción se contempla el uso del

lactosuero en procesos de fermentación de los cuales se pueden obtener otros compuestos de valor agregado [111]. La tercera opción es la aplicación de tratamientos fisicoquímicos como coagulación y floculación entre otros [99].
En este trabajo de investigación se pondrá en práctica la segunda opción utilizando la lactosa presente en el suero para obtener un biogás rico en hidrógeno.

Existen estudios previos para valorizar el suero de leche utilizándolo como sustrato en la producción de nuevos compuestos con mayor valor agregado. A continuación, en la tabla 1-5 se muestran algunos resultados de estudios relacionados con la producción de hidrógeno.

Tabla 1-5 Procesos de valorización del suero de leche

Microorganismo	Producto	Método	Rendimiento	Ref
C. saccharoperbutyl-acetonicum ATCC 27021	H_2, CO_2 Ácidos orgánicos	Fermentación oscura (Suero 87.5% V/V)	7.89 mol H_2 kg^{-1} lactosa	[112]
Lodo anaeróbico	H_2, CO_2 Ácidos orgánicos	Fermentación oscura termofílica (28.5 g lactosa L^{-1})	1.03 mol H_2 mol^{-1} glucosa	[113]
Rhodospirillum rubrum	H_2, CO_2	Fotofermentación (470 mM lactato)	20 ml H_2 L^{-1} h^{-1}	[62]
Lodo granular anaeróbico	H_2, CO_2, CH_4 Ácidos orgánicos Etanol	Fermentación oscura (Suero 30 g/L)	3.1 mol H_2 mol^{-1} lactosa	[114]
Lodo granular termófilo anaeróbico	H_2, CO_2 Ácidos orgánicos	Fermentación oscura termofílica (Suero 25% v/v)	3.67 mol H_2 mol^{-1} lactosa	[115]
Rhodobacter sphaeroides O.U. 001	H_2, CO_2	Fotofermentación (Suero 40% v/v)	27.69 L H_2 L^{-1} Residuo lácteo	[116]
E. aerogenes MTCC 2822/ *Rhodopseudomonas* BHU01	H_2, CO_2 Ácidos orgánicos	Integrado secuencial (10 g Lactosa L^{-1})	58 mmol H_2 L^{-1} h^{-1}	[117]
Rhodobacter capsulatus B10::LacZ	H_2, CO_2	Fotofermentación (Lactosa 0.2M)	0.55 mol H_2 mol^{-1} lactosa	[81]

Como se puede observar en su mayoría los estudios están relacionados con la fermentación oscura, esto se debe a que los microorganismos que realizan la fotofermentación comúnmente no pueden utilizar la lactosa como sustrato. Por este motivo,

los estudios de fotofermentación realizados con suero de leche son procesos integrados o algunos en los cuales solo se consume el ácido láctico presente en el suero (principalmente el suero ácido) dejando la lactosa intacta.

Este proyecto de investigación presenta una alternativa para la producción fotofermentativa de hidrógeno mediante el uso de cepas recombinadas para aprovechar la lactosa. Esta recombinación consiste en la adición de un plásmido que contiene gen LacZ, el cual codifica la enzima β-galactosidasa, que cataliza la reacción de hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa [118].

En estudios anteriores a este proyecto se utilizó la bacteria recombinada *Rhodobacter capsulatus* B10::LacZ para producción de hidrógeno mediante fotofermentación utilizando suero de leche sintético como sustrato. Los resultados no fueron los esperados ya que alrededor del 60% de la lactosa no fue consumida por la bacteria reduciendo la eficiencia del proceso. La producción total, la productividad y la eficiencia producto sustrato fueron 4000 ml L^{-1}, 14ml $L^{-1}h^{-1}$ y 0.55 mol H_2 mol C^{-1} respectivamente.

Respecto a estos resultados se planteó un problema de investigación:

Una parte importante de los nutrientes presentes en el suero de leche no son utilizados en el proceso de producción de hidrógeno mediante fotofermentación, lo cual disminuye la eficiencia y productividad.

De acuerdo con este problema se generaron dos preguntas de investigación:

- ¿Es posible mejorar esta productividad y la eficiencia al variar las condiciones del medio?
- ¿Adicionar una etapa de homofermentación láctica al pretratamiento del suero, aumentando la disponibilidad de acidó láctico en el medio inicial, mejoraría la eficiencia del proceso?

Con base a las preguntas de investigación se plantearon los objetivos de la tesis de doctorado.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Desarrollar una metodología biotecnológica de producción de hidrógeno con la cual se valorice el suero de leche, al emplearlo como sustrato en la fotofermentación realizada por cepas recombinadas de la bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus.*

1.2.2 Objetivo Específicos

- Establecer la relevancia e influencia de las variables:
    - Intensidad lumínica
    - Cepas Bacterianas (B10::LacZ, IR3::LacZ)
    - Solución amortiguadora
    - Concentración de fuente de carbono
    - Concentración de fuente de nitrógeno
    - Concentración de molibdeno
    - Y las interacciones entre ellos.

En el proceso de producción de hidrógeno.

- Evaluar experimentalmente, el efecto de adicionar un proceso de homofermentación láctica en el pretratamiento del suero, sobre la producción de hidrógeno.

- Escalar los experimentos utilizando las condiciones óptimas encontradas en el desarrollo del diseño de experimentos y evaluar el efecto del control del pH.

2. Materiales y metodología general

El objetivo de este capítulo es describir la metodología que comparten las diferentes etapas del proyecto con el fin de evitar su repetición continua en el documento, de esta forma cuando se requiera se referenciarán las diferentes subsecciones de este capítulo. Materiales y reactivos utilizados, así como la preparación y análisis de las muestras y técnicas analíticas utilizadas serán descritas en este capítulo.

The main purpose of this chapter is to describe the general methodology of the stages to avoid its repetition in the document. The different subsections of this chapter will be mentioned in the document above as required. Materials, reagents, analytical techniques and samples analysis methodology will be described in this chapter.

2.1 Microrganismos utilizados

2.1.1 *Rhodobacter capsulatus*

Para el proceso de producción de hidrógeno mediante fotofermentación se utilizaron dos cepas recombinadas de la bacteria purpura no sulfurosa *Rhodobacter capsulatus*: B10:LacZ (silvestre) e IR3:LacZ (mutante) [39,119], ambas cepas fueron proporcionadas por el Dr. John Willison, investigador de CEA en Grenoble quien es asesor del proyecto de doctorado. La cepa IR3::LacZ fue aislada después del proceso de mutagénesis con N-metil N-nitrosoguanidina. Esta cepa presenta un incremento del 30% en la producción de hidrógeno respecto a la cepa silvestre B10 [95].

La recombinación de las cepas utilizadas consistió, en la inserción de un plásmido que contiene gen LacZ, el cual codifica la enzima β-galactosidasa. Esta modificación actúa bajo la dependencia del promotor *nifH* de la nitrogenasa, por lo que se espera que la síntesis

de las enzimas que permiten la degradación de lactosa se efectúe solamente bajo las condiciones de expresión de esta última enzima [95,120,121].
El almacenamiento de estas cepas (B10::LacZ e IR3::LacZ) se realizó en tubos estériles de 15ml, refrigerados a 4°C.

2.1.2 Lactococcus lactis

En la segunda etapa del proyecto, capitulo 3, se incluye la adición de una etapa de homofermentación. Se pretende incrementar la concentración de ácido láctico disponible en el medio para que la bacteria fotosintética.
Como bacteria homofermentativa se utilizó una mezcla comercial para cultivos mesófilos liofilizados de la empresa DANISCO: Choozit ™ MA que está constituida por *Lactococcus lactis* subsp *lactis y Lactococcus lactis* subsp *cremoris.*
El almacenamiento de estas cepas se realizó en su presentación liofilizada en sobres a 4°C.

2.2 Medios de cultivo

2.2.1 *Rhodobacter capsulatus*

El medio de crecimiento de la bacteria es el medio RCV [119], el cual contiene: ácido glutámico (7 mM); lactato de sodio (30 mM); solución buffer fosfato (9.58 mM), $MgSO_4.7H_20$, 120 mg L^{-1}; $CaCI_2$ $2.H_20$, 75 mg L^{-1}; Fe-EDTA, 29 mg L^{-1}; trazas de elementos (H_3BO_3, $MnSO_4.H_20$, $NaMoO_4.2H_20$, $ZnSO_4.7H_20$, $CuSO_4.5H_20$,) tiamina clorhidrato, 1 mg L^{-1}. El pH se ajusta a 6.8 y se esteriliza el medio en autoclave por 15 minutos a 15 psi. Se adiciona tetraciclina al medio de cultivo (0.5 μg ml^{-1}).

A este medio de cultivo se le realizó una adaptación cambiando la solución amortiguadora por una que contiene bórax (solución amortiguadora de Kolthoff) [122]. Con el fin de mantener constante la concentración de fosfato en el medio se utilizó una concentración para la solución de Kolthoff de 18 mM. El propósito de evaluar la solución Kolthoff es presentar una alternativa más económica frente a la solución comúnmente utilizada (solución fosfato).

2.2.2 Preparación del inóculo

El inóculo se desarrolló en tubos Falcon de 15 ml con medio RCV a 30 ºC por 48 horas y una intensidad lumínica de 20.000 lx. Se prepararon dos tipos de inóculo diferentes: uno con buffer fosfato (K_2HPO_4/KH_2PO_4) y otro con buffer Kolthoff ($KH_2PO_4/Na_2B_4O_7.10H_2O$). para mejorar la adaptación del microorganismo a su posterior medio de cultivo.

La determinación de la cantidad de inóculo requerida en cada biorreactor se realizó experimentalmente con el criterio de estandarización de absorbancia para asegurar que se está agregando aproximadamente la misma cantidad de bacterias en cada experimento. Se estableció que una absorbancia de 1.0 a 660 nm equivale a los gramos de peso seco que se expresan en la tabla 2-1 (Ver Anexo A)

Tabla 2-1 Relación de peso seco y Absorbancia
(Equivalente de 1.0 a 660nm)

Cepa	Peso seco mg L^{-1}
Rhodobacter capsulatus B10	0.19
Rhodobacter capsulatus IR3	0.17
Rhodobacter capsulatus B10::LacZ	0.19
Rhodobacter capsulatus IR3::LacZ	0.18

2.2.3 Lactococcus lactis

El medio de crecimiento de la bacteria es directamente el suero de leche (Cimpa s.a.s) reconstituido con una dilución de 1/10. Se pesan 0.5 g de biomasa liofilizada y se adicionan en 15ml de suero reconstituido previamente esterilizado mediante microfiltración. El inóculo crece en este medio a 30 ºC por 24 horas, en la oscuridad y sin agitación.

2.3 Descripción del sistema de fermentación

Los cultivos por lotes se realizaron en reactores de vidrio con capacidad de 125 ml (medidas: 4.5*7.5*2.5 cm). La forma de estos reactores es rectangular, de lado plano para asegurar que la intensidad lumínica que llegue a toda la botella sea aproximadamente la misma. Los reactores fueron sellados herméticamente utilizando corchos de goma. (Ver figura 2-1). El volumen adicionado de medio en estos reactores es de 110 ml.

Los experimentos se realizaron en una incubadora termo-regulada (60*60*160 cm), iluminada internamente con una bombilla de sodio (OSRAM, Plantastar 150W) como se puede observar en la figura 2-2. Esta bombilla actúa como fuente lumínica de energía para las bacterias en el proceso de fotosíntesis. Alrededor de la bombilla se encuentran ubicados agitadores sobre los cuales se colocaron los biorreactores. La intensidad lumínica requerida para los experimentos depende de la distancia a la cual se encuentran los biorreactores, de la bombilla. Para medir la intensidad de luz se utilizó un luxómetro digital (Meter, RO 1332).

Figura 2-1 Reactores de 125 ml (Fotografía)

Antes del cultivo | Después del cultivo.

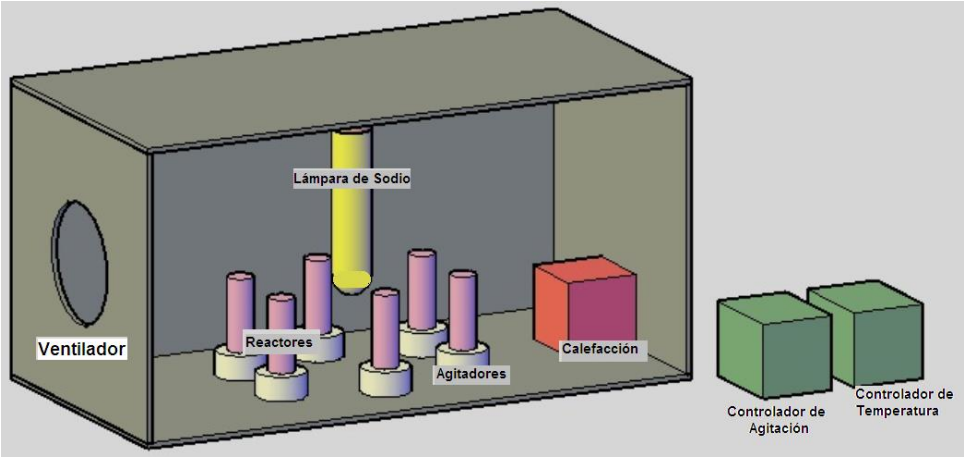
El sistema de control de temperatura está conformado por un calefactor, extractor de aire y ventiladores conectados a un controlador que busca mantener la temperatura en la incubadora lo más homogénea posible a 30±2 ºC.

El sistema de control de agitación se instaló con el fin de asegurar que la velocidad de agitación fuera lo más similar posible para todos los reactores. Consta de un sistema de reguladores de flujo eléctrico el cual permite incrementar o disminuir la velocidad de los agitadores. La agitación se realizó con agitadores magnéticos ubicados en el interior de cada botella.

El sistema de recolección y medición de la producción de hidrógeno se fundamenta en el principio de desplazamiento de volumen; se utilizaron probetas invertidas llenas de una solución de $CuSO_4.7H_2O$ 0.1 M, lo cual facilitó la medida debido a su coloración y adicionalmente evita la contaminación biológica del agua.

Las probetas están conectadas a tubos de nylon de 2 mm de diámetro con la punta de una jeringa en un extremo, ésta es insertada en la tapa de las botellas. Mediante esta conexión se capta el gas generado, el cual desplaza la solución dentro de la probeta y así se mide el volumen producido. Este sistema se puede observar en la figura 2-3.

Figura 2-2 Esquema de la cámara de reacción



Con el fin de conocer la tendencia y velocidad de la producción de biogás de los reactores se decidió instalar un sistema de cámaras que toman fotografías cada hora de las probetas. Para esto se utilizó un equipo Raspberry programado que además sube estas fotos a *Dropbox* para tener un control de los cambios del volumen en las probetas de forma más específica.

Figura 2-3 Fotografía del sistema de seguimiento producción de H_2

La figura 2-3 muestra el sistema de cámaras empleado y se puede observar la evolución del nivel de las probetas para el día: 27/03/2017 10:00 am.

2.4 Técnicas Analíticas

2.4.1 Determinación de pH

La medición del pH se realizó con un potenciómetro *Thermo scientific Orion Star 4-star*, previamente calibrado con soluciones buffer de pH 4, 7 y 10. Periódicamente (dos veces por semana) se reajustó el pHmetro como es requerido para asegurar la exactitud de los resultados.

2.4.2 Determinación de azúcares y ácidos

Se realizaron determinaciones de la concentración de azúcares (lactosa, galactosa y glucosa) y ácidos (láctico, acético entre otros) para cada experimento tanto al iniciar como al terminar los ensayos para cuantificar el consumo y la formación de los mismos.

Se utilizó HPLC (Agilent, Infinity 1200) para estas determinaciones con las siguientes condiciones: Columna Repromer RM9H0S2508, a una temperatura de 30°C, con ácido sulfúrico 0.5% p/p como fase móvil, a un flujo de 0.4 ml min^{-1} y con 20 µL de volumen de inyección. El detector utilizado fue IR (índice de refracción).

En el Anexo B se pueden observar más detalles.

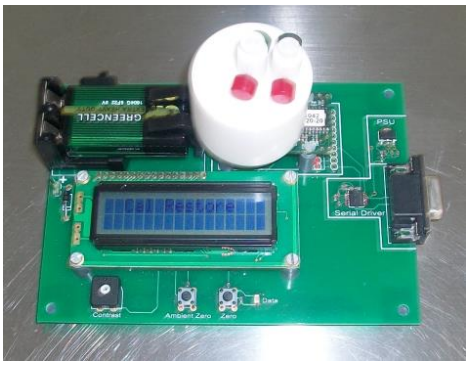
2.4.3 Determinación de proteínas solubles

La determinación de proteínas solubles se realizó utilizando el método de Folin y Lowry [123]. Para la curva de calibración se utilizó albumina de suero bovino (BSA). En el Anexo C se encuentra una descripción más detallada.

2.4.4 Determinación de H_2 y CO_2

La medición de dióxido de carbono en fase gaseosa se realizó con un sensor (2112BC20-KIT, Euro-Gas Management Services Ltd, UK) figura 2-4. Para calibrar el sensor en la concentración cero se utilizó nitrógeno.

Figura 2-4 Fotografía del sensor de CO_2



Para determinar la composición del biogás de forma cualitativa se utilizó el micro cromatógrafo de gases C2V-200 utilizando como fase móvil argón.

Se determinó el tiempo de retención de hidrogeno en 10 segundos, el de dióxido de carbono y metano en 12 y 13 segundos respectivamente.

Para realizar la caracterización del biogás se tomó una muestra de 5 ml directamente del reactor en una jeringa estéril y se inyectó en el cromatógrafo.

Debido a que la bacteria solo produce un biogás compuesto de hidrógeno y dióxido de carbono la concentración de H_2 se calculó mediante la diferencia con la concentración de CO_2[123].

2.5 Procesamiento de muestras

Para tomar muestras del medio y conocer su condición ya sea al final o en cualquier momento durante el experimento, se procesaron las muestras con la siguiente metodología:

- **Concentración del microorganismo en el medio**: Se realizó la medición del peso seco mediante dos procedimientos. El primero consiste en medir la densidad óptica del medio y relacionarla con su peso seco. La gráfica presentada en el Anexo A permite conocer la concentración de bacteria en el medio. El peso seco se determinó con una metodología similar a la que se presenta en el Anexo A. En este caso se tomaron 2 ml de muestra, se centrifugaron y posteriormente se retiró el sobrenadante. El precipitado es lavado con agua desionizada y se agrega a un tubo Eppendorf previamente pesado. A continuación, se coloca el tubo en el horno a 80

°C por 48 horas. Finalmente se pesa el tubo. La diferencia entre este peso y el peso inicial representa el peso seco de 2 ml de medio.

- **pH de la solución**: se requiere medir el pH para conocer la evolución del mismo en el tiempo de experimentación. En este caso se toman 2ml de muestra y se mide su pH.
- **Composición del medio**: Se mide la composición del medio para conocer las cinéticas de consumo y de producción de algunas sustancias. Se toma una muestra de 2 ml y se centrifuga a 1300 rpm por 5 minutos. El sobrenadante resultante se separa, se diluye y filtra (filtro de nitrocelulosa 0.22 µM) según se requiera para analizar la muestra posteriormente por cromatografía liquida HPLC (Anexo B).

2.6 Diseño de experimentos

Para el desarrollo de la investigación se utilizó el *software* estadístico *Design Expert* 8.0 como una herramienta para la generación de las matrices de experimentos y posterior análisis de los resultados. Para utilizar esta herramienta de forma adecuada es necesario comprender la metodología de diseño de experimentos (DOE por sus siglas en ingles).

El DOE es una técnica estadística utilizada para explorar y analizar procesos, también se puede utilizar para buscar su optimización mejorando el rendimiento y productividad [124]. Buscando un método más eficiente para la realización de experimentos se utilizó un acercamiento estadístico. Con lo cual se reduce el número de experimentos y recursos usados y se maximiza la información que se puede extraer de los experimentos realizados [124].

La selección del diseño que se debe utilizar se realiza principalmente de acuerdo con dos criterios:

- El número de factores estudiados.
- El objetivo de la experimentación

Según estos criterios tomados del libro “Design of Experiments for Reinforcement Learning”, se describen los modelos relevantes para la experimentación realizada en el proyecto [125].

- **Experimentos de sondeo**
    - **Número de factores estudiados:** Elevado.

- **Objetivo de experimentación:** Identificar cuales factores tienen una influencia significativa sobre la respuesta para disminuir el número de los que se van estudiar en etapas posteriores.

Cada factor se evalúa en dos niveles resultando un diseño 2^k.

- **Diseño Factorial Completo**
  - **Número de factores estudiados:** Pocos factores y niveles.
  - **Objetivo de experimentación:** Obtener un modelo que describa la relación entre las variables principales y las interacciones sobre la respuesta estudiada.

El diseño evalúa múltiples factores con múltiples niveles. Cada posible combinación se utiliza, para k factores con n niveles hay n^k combinaciones. La inversión en tiempo y materiales para realizarlo es muy elevada pues no solo se deben hacer todos los experimentos, sino que además se deben hacer replicas.

- **Diseño Factorial Fraccionado**
  - **Número de factores estudiados:** Alto
  - **Objetivo de experimentación:** Obtener un modelo que describa la relación entre las variables principales y las interacciones sobre la respuesta estudiada. Se asume que interacciones de alto orden son insignificantes

    Este diseño se fundamenta en el diseño Factorial completo, pero solo se utiliza un subconjunto de las posibles combinaciones factor-nivel así: n^{k-p}. Un valor más alto de p resulta en un diseño más corto, pero esto también resulta en más efectos siendo ignorados en el modelo. Estos diseños son una opción cuando los recursos de materiales o tiempo son limitados.

- **Métodos de superficie de respuesta**
  - **Número de factores estudiados:** Alto
  - **Objetivo de experimentación:** Obtener una superficie de respuesta que describa la relación entre las variables principales y las interacciones sobre la respuesta estudiada.

Las superficies de respuesta se pueden utilizar como un modelo para el sistema en estudio, o para determinar un conjunto de condiciones que lleven a una respuesta

óptima dentro de los intervalos estudiados. Para esto se lleva a cabo un diseño experimental más sofisticado, como los diseños Compuestos Centrales (CCD), Box-Behnken (BBD) u Optimal.

Para evaluar la significancia y pertinencia de los modelos obtenidos se realiza un análisis de varianza ANOVA.

Para la tesis se utilizó el método de **superficie de respuesta** diseño **compuesto centrado**. Esta selección se realizó teniendo en cuenta el número de variables de trabajo, cinco para la primera etapa y tres para la segunda etapa, y el objetivo del estudio que era encontrar un modelo que representará correctamente la relación entre las variables y la respuesta, permitiendo identificar las condiciones en las que mejora la respuesta analizada.

3. Modelamiento de la producción de hidrógeno con la bacteria *Rhodobacter capsulatus cepas IR3::LacZ y B10::LacZ:* Análisis con suero de leche sintético

El propósito de esta etapa del proyecto de investigación es identificar las variables más relevantes para la producción fotofermentativa de hidrógeno. Se utilizó suero sintético en los experimentos, con el fin de tener un mayor control de las variables y estudiar su efecto individual y posibles interacciones. Se estudió la influencia de siete variables, cinco continuas: pH inicial (6.8 - 7.8), concentración de lactosa (0.05 – 0.15 M), concentración de lactato (5 – 30 mM), concentración de glutamato (7 – 50 mM) e intensidad lumínica (8000 – 30000 lx) y dos variables discretas: naturaleza del buffer (Kolthoff – Fosfato) y cepa (*Rhodobacter capsulatus:* IR3::LacZ y B10::LacZ). La metodología de superficie de respuesta fue usada para modelar y encontrar las mejores condiciones de producción de hidrógeno. Como resultado de este estudio se encontró que la cepa que presentó mayor producción fue la IR3::LacZ. Por otra parte, se comprobó que es posible reemplazar la solución amortiguadora fosfato con la solución de Kolthoff, obteniendo incluso una mejor producción de hidrógeno con esta última. Con los resultados obtenidos en esta etapa se seleccionó la cepa IR3::LacZ para continuar con los experimentos con suero de leche industrial.

The purpose of this stage is to identify the most relevant variables for the photofermentative production of hydrogen with cheese whey. Synthetic whey was used in the experiments to have greater control of the variables and study their individual effect and possible interactions. The influence of seven variables was studied, five continuous: initial pH (6.8 - 7.8), lactose concentration (0.05 - 0.15 M), lactate concentration (5-30 mM), glutamate concentration (7 - 50 mM) and intensity light (8000 - 30000 lx) and two discrete: Buffer (Kolthoff - Phosphate) and train (*Rhodobacter capsulatus*: IR3 :: LacZ and B10 :: LacZ).

Response surface methodology was applied to model and find the best hydrogen production conditions. As a result of this study it was found that the strain with the highest production was IR3::LacZ. Besides, it was proved that it is possible to replace phosphate buffer with the Kolthoff solution, even obtaining a better hydrogen production. With the results obtained in this stage, the strain IR3::LacZ was selected to continue with the experiments with industrial whey.

3.1 Introducción

Como inicialmente se indicó el hidrógeno es actualmente una fuente de energía promisoria para el futuro, limpia y renovable. Ya que al oxidarlo no produce grandes cantidades de gases de efecto invernadero, existe la posibilidad de utilizarlo en combustión, procesos electroquímicos y en pilas combustibles para obtener energía [15,126,127].

Entre los procesos de obtención de hidrógeno, la producción biológica sobresale por el ahorro de energía que representa y por su bajo impacto en el medio ambiente. Además, este tipo de procesos permite el uso de sustancias de desecho de diferentes industrias lo cual incrementa el interés en estas tecnologías [128,129]. Sin embargo su baja eficiencia hace que muchos esfuerzos se estén realizando actualmente para mejorar los rendimientos[15,18,41,130–133].

La fotofermentación se lleva a cabo por bacterias fotosintéticas, en este proyecto se utilizó *Rhodobacter capsulatus* cepas IR3::LacZ y B10::LacZ. Para realizar la selección de los intervalos de estudio de las variables se tomó como base los resultados de los diferentes estudios que se han realizado hasta el momento en el grupo de investigación y la revisión bibliográfica. Entre las variables analizadas se incluyen condiciones como relación carbono/nitrógeno, diferentes fuentes de carbono, pH, temperatura del proceso, concentración de iones e intensidad de la luz [38,59,134–136].

El estudio de la producción de hidrógeno se realizó en procesos por lotes utilizando reactores de 125 ml con suero de leche sintético como sustrato. Se empleó un medio sintético para emular la composición del suero de leche industrial con el fin de identificar como los principales componentes de este sustrato afectan tanto el crecimiento del microorganismo como la producción de hidrógeno. De esta forma, se encontraron las condiciones para obtener los mayores rendimientos utilizando el suero de leche como sustrato.

3.2 Métodos y Materiales

3.2.1 Microorganismo y medio

Los microorganismos utilizados fueron las cepas recombinadas de la bacteria *Rhodobacter capsulatus*, IR3::LacZ y B10::LacZ [95,120,121]. El medio de crecimiento de la bacteria es el medio RCV descrito con anterioridad al igual que el procedimiento para preparar el inóculo. (ver secciones 2.2.1 y 2.2.2)

3.2.2 Diseño de experimentos para suero sintético

Para determinar cuáles de los factores estudiados son relevantes para la producción de hidrogeno y conocer su influencia se utilizó la metodología de Superficie de Respuesta, modelo centrado en la cara. Utilizando el software estadístico Design Expert 8.0 (Stat Ease, Minneapolis, USA) se obtuvo una matriz de 33 experimentos para el estudio de las 5 variables continuas que se explicarán a continuación. Esta matriz de experimentos cuenta con repeticiones en los puntos de valor medio, las cuales permiten determinar el error experimental utilizando el análisis Anova.

Se evaluaron dos variables discretas cada una con dos niveles con lo cual se obtuvo un diseño total de 132 experimentos. Para la cepa B10::LacZ solución fosfato no fue posible obtener un modelo que ajustara adecuadamente con la matriz inicial, por lo que se decidió adicionar tres experimentos, esta adecuación permitió obtener un modelo del sistema (tabla 3-1). Las variables estudiadas en la primera etapa del proyecto fueron:

- **A:** pH inicial

Se estudió el pH inicial del medio debido a que existe una disminución progresiva del mismo en los reactores al consumir los sustratos. El intervalo de estudio se seleccionó respecto a las condiciones de pH en las cuales puede crecer y producir hidrógeno la bacteria. El intervalo de pH fue: 6.8 - 7.8.

- **B:** Concentración de lactosa **y C:** Concentración de lactato (fuente de carbono)

Se evaluó la concentración de estas dos importantes fuentes de carbono presentes en el suero de leche. Los intervalos de estudio se determinaron según las concentraciones que se pueden encontrar en el suero de leche industrial y en las que según experiencia previa puede crecer y producir hidrógeno la bacteria [81]. La concentración de lactosa varió en un intervalo de 0.05 a 0.15 M. y la concentración de lactato entre 5 y 30 mM.

Tabla 3-1 Matriz de Experimentos suero sintético

Corrida	pH inicial	[Lactosa] M	[Lactato] (mM)	[Glutamato] (mM)	Intensidad Lumínica (Lx)
1	6.8	0.15	30	50	5000
2	7.8	0.15	5	50	5000
3	6.8	0.05	5	50	5000
4	6.8	0.15	5	7	5000
5	6.8	0.15	5	50	30000
6	7.3	0.1	17.5	28.5	17500
7	7.3	0.1	17.5	28.5	17500
8	7.3	0.1	17.5	28.5	17500
9	7.8	0.15	30	7	5000
10	7.3	0.1	17.5	28.5	17500
11	7.8	0.05	30	50	5000
12	6.8	0.05	5	7	30000
13	7.3	0.15	17.5	28.5	17500
14	7.3	0.1	17.5	7	17500
15	7.3	0.1	5	28.5	17500
16	7.3	0.1	30	28.5	17500
17	7.3	0.05	17.5	28.5	17500
18	7.3	0.1	17.5	28.5	30000
19	6.8	0.15	30	7	30000
20	7.3	0.1	17.5	28.5	17500
21	7.3	0.1	17.5	28.5	17500
22	6.8	0.05	30	7	5000
23	7.8	0.05	5	50	30000
24	7.3	0.1	17.5	28.5	5000
25	7.8	0.05	5	7	5000
26	7.8	0.15	5	7	30000
27	7.8	0.15	30	50	30000
28	7.3	0.1	17.5	50	17500
29	6.8	0.05	30	50	30000
30	7.8	0.1	17.5	28.5	17500
31	7.8	0.05	30	7	30000
32	7.3	0.1	17.5	28.5	17500
33	6.8	0.1	17.5	28.5	17500
34*	7.8	0.15	30	7	5000
35*	7.3	0.1	17.5	7	17500
36*	6.8	0.1	17.5	28.5	17500

*Experimentos agregados para B10::LacZ con la solución amortiguadora fosfato

- **D:** Concentración de glutamato (Fuente de nitrógeno)

La fuente de nitrógeno utilizada fue glutamato. La concentración de glutamato varió en un intervalo de 7 a 50 mM [38]. Este estudio es importante ya que es un acercamiento a cómo afecta la concentración de fuente de nitrógeno a la producción de hidrógeno.

- **E:** Intensidad lumínica

Para la fotofermentación es necesaria una fuente lumínica para que la bacteria lleve a cabo la fotosíntesis. Se estudió la intensidad lumínica ajustando la proximidad de los reactores a una bombilla de sodio (apartado 2.3). Para esta experiencia se probaron intensidades en el intervalo de 5000-30000 lx [38,81].

- Solución amortiguadora

La solución amortiguadora que se utiliza normalmente es la solución de fosfato K_2HPO_4/KH_2PO_4 0.64M [119]. Sin embargo, también se estudió la solución de Kolthoff $KH_2PO_4/Na_2B_4O_7.10H_2O$ con la que ya se ha trabajado anteriormente en proyectos del grupo de investigación y que ha demostrado buenos resultados para la producción de hidrógeno. Además, el uso de esta solución es interesante debido a que el bórax es una sustancia de menor precio, comparado con los fosfatos [122].

- **Cepa**

Se comparan las cepas IR3::LacZ y B10::LacZ .

3.2.3 Experimentos por lotes

Los experimentos se realizaron en reactores de cara plana de vidrio de 125ml herméticos, cerrados con un tapón de caucho, con un agitador magnético para mezclar el medio y se llenaron con un volumen total de 110 ml. Los reactores se ubicaron en la cámara termorregulada que se describe en la sección 2.3 a una temperatura de 30°C. El biogás se midió mediante el sistema basado en el desplazamiento de volumen.

3.2.4 Procesamiento de muestras

Al finalizar los experimentos se realiza un análisis del medio final del reactor para determinar: pH, densidad óptica, peso seco y composición del medio.

La metodología de procesamiento de muestras se encuentras descrita de forma más específica en la sección 2.5.

3.3 Resultados y Análisis Suero sintético

En las tablas 3-2 a 3-5 se presentan los resultados de los experimentos.

Se midió la producción total de biogás expresada en mililitros. Este biogás es rico en hidrógeno, pero incluye CO_2 el cual está presente en un valor no mayor de 25%. Bajo estas condiciones el biogás se puede utilizar directamente sin tratamiento en una pila combustible de membrana de intercambio de protones (*PEM fuel cell*) [14].

Tabla 3-2 Resultados suero sintético *Rhodobacter capsulatus* B10::LacZ (Fosfato)

Corrida	Producción Biogás (ml L^{-1})	Peso Seco (g ml^{-1})	pH final	% conversión Lactosa	% Rendimiento $Y_{real}/Y_{teórico}$
1	1018.18	0.0034	5.2	19.0	2.4
2	945.45	0.00225	5.17	15.7	2.4
3	1381.82	0.00325	5.12	71.3	9.9
4	1672.73	0.0031	4.98	25.4	3.8
5	1945.45	0.00485	5.26	36.6	4.7
6	2745.45	0.00365	5.02	39.4	10.6
7	2272.73	0.00435	5.5	69.2	8.6
8	2845.45	0.0038	5.24	53.3	11.2
9	3727.27	0.00235	5.2	95.9	8.4
10	2472.73	0.0045	5.17	60.3	10.2
11	6000.00	0.00365	5.44	81.1	35.9
12	1563.64	0.0029	5.2	38.0	10.5
13	2036.36	0.00415	5.19	95.0	5.0
14	4400.00	0.0023	4.79	98.4	14.9
15	781.82	0.0042	5.6	38.8	3.3
16	890.91	0.005	5.43	92.8	2.9
17	1872.73	0.0055	5.43	78.4	12.3
18	781.82	0.0047	5.23	70.0	3.0
19	963.64	0.0018	5.83	98.4	2.1
20	2363.64	0.0052	5.17	52.9	8.1
21	2127.27	0.00395	5.18	49.6	7.6
22	1109.09	0.0028	5.19	95.7	6.7
23	981.82	0.0003	5.09	35.9	7.3
24	1781.82	0.0027	5.15	30.3	7.0
25	618.18	0.00305	5.5	67.0	4.7
26	927.27	0.0046	5.43	50.4	2.4
27	2181.82	0.0034	5.69	79.8	10.1
28	6181.82	0.0038	5.1	77.4	20.7
29	5309.09	0.00405	5.33	78.3	33.3
30	2327.27	0.00375	5.27	47.5	8.2
31	1472.73	0.0013	4.96	94.8	8.8
32	2309.09	0.0047	5.22	58.5	8.0
33	1490.91	0.0036	5.38	94.4	5.5
34	2872.73	0.00192	5.23	98.4	6.4
35	4227.27	0.00325	5.06	99.4	13.7
36	2800.00	0.00295	5.1	62.2	9.4

Tabla 3-3 Resultados suero sintético *Rhodobacter capsulatus* B10::LacZ (Kolthoff)

Corrida	Producción Biogás (ml L^{-1})	Peso Seco (g ml^{-1})	pH final	% conversión Lactosa	% Rendimiento $Y_{real}/Y_{teórico}$
1	600.00	0.0021	5.23	22.09	1.3
2	1072.73	0.0001	5.12	18.28	2.6
3	1145.45	0.0052	5.17	65.32	8.2
4	1909.09	0.0023	4.91	25.30	4.3
5	1254.55	0.0047	4.69	32.36	2.9
6	1181.82	0.0033	5.21	51.66	4.0
7	1854.55	0.0034	5.41	96.78	6.3
8	1718.18	0.0037	5.09	55.56	5.9
9	1127.27	0.0018	5.21	68.59	2.5
10	1200.00	0.0034	5.18	80.25	4.0
11	5945.45	0.0007	5.15	64.39	36.2
12	936.36	0.0020	4.99	97.13	6.5
13	1963.64	0.0032	5.05	60.58	4.4
14	2490.91	0.0017	5.13	98.05	8.0
15	545.45	0.0053	4.72	43.77	1.9
16	2018.18	0.0042	5.15	54.40	6.4
17	3090.91	0.0031	5.28	73.59	20.2
18	1527.27	0.0036	5.26	77.61	5.3
19	1763.64	0.0024	5.16	98.55	3.9
20	2127.27	0.0032	5.05	50.70	7.2
21	1654.55	0.0044	5.07	68.45	5.4
22	3109.09	0.0012	5.37	96.55	19.0
23	2127.27	0.0025	5.63	65.82	14.7
24	645.45	0.0020	5.12	31.71	2.1
25	2500.00	0.0013	5.13	97.04	17.4
26	1563.64	0.0014	5.35	98.48	3.7
27	4163.64	0.0005	5.4	80.43	9.2
28	4145.45	0.0036	5.12	63.14	13.7
29	5345.45	0.0033	5.24	85.39	32.5
30	1554.55	0.0026	5.07	42.35	9.3
31	3236.36	0.0015	5.27	97.55	17.6
32	1945.45	0.0037	5.18	63.76	6.6
33	1136.36	0.0050	5.15	43.97	4.0

Tabla 3-4 Resultados suero sintético *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ (Fosfato)

Corrida	Producción Biogás (ml L^{-1})	Peso Seco (g ml^{-1})	pH final	% conversión Lactosa	% Rendimiento $Y_{real}/Y_{teórico}$
1	9127.27	0.0035	5.42	81.8	19.1
2	4100.00	0.0016	5.16	46.6	6.2
3	1090.91	0.0024	5.33	70.0	8.1
4	2990.91	0.0025	4.9	33.5	5.9
5	2527.27	0.0057	4.69	51.5	4.2
6	7854.55	0.0036	5.35	89.4	22.5
7	6809.09	0.0042	5.45	88.6	19.2
8	7072.73	0.0039	5.33	76.1	13.6
9	4018.18	0.0019	4.35	80.2	5.4
10	6181.82	0.0033	4.93	58.2	22.1
11	4618.18	0.0021	4.74	97.5	22.8
12	3136.36	0.0034	4.94	49.7	21.6
13	8309.09	0.0053	5.25	83.3	11.9
14	5163.64	0.0027	4.95	97.8	15.6
15	2736.36	0.0038	5.12	84.7	9.7
16	6981.82	0.0038	5.17	69.3	20.7
17	4927.27	0.0033	5.43	98.0	27.1
18	7472.73	0.0034	4.95	91.3	19.8
19	4727.27	0.0017	4.64	97.5	10.3
20	6363.64	0.0043	5.29	87.5	28.9
21	6090.91	0.0043	5.28	78.7	20.2
22	4109.09	0.0017	5.45	90.0	20.1
23	4181.82	0.0010	5.09	58.9	27.1
24	7290.91	0.0037	4.83	56.8	24.3
25	2200.00	0.0018	4.97	69.2	11.3
26	4254.55	0.0025	4.43	98.2	11.1
27	4090.91	0.0005	5.31	39.6	7.7
28	6954.55	0.0055	5.33	87.4	12.2
29	6545.45	0.0039	5.15	90.9	30.5
30	5927.27	0.0037	5.15	82.1	18.8
31	3745.45	0.0018	5.24	94.4	17.4
32	6309.09	0.0040	5.2	74.2	20.7
33	4745.45	0.0037	5.31	82.6	8.8

Tabla 3-5 Resultados suero sintético *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ (Kolthoff)

Corrida	Producción Biogás (ml L^{-1})	Peso Seco (g ml^{-1})	pH final	% conversión Lactosa	% Rendimiento $Y_{real}/Y\ t_{eórico}$
1	10745.45	0.0031	5.64	95.9	22.2
2	3027.27	0.0026	5.26	54.3	6.8
3	3018.18	0.0039	5.29	73.2	17.2
4	2272.73	0.0023	5.38	39.7	4.5
5	9700.00	0.0054	5.49	91.0	17.6
6	7409.09	0.0027	5.38	98.7	19.3
7	6663.64	0.0027	5.4	97.8	17.1
8	6409.09	0.0022	5.08	98.4	17.2
9	7827.27	0.0017	5.38	95.1	14.0
10	9390.91	0.0029	5.45	98.2	25.1
11	3781.82	0.0015	5.81	96.1	18.9
12	3636.36	0.0017	4.9	96.2	20.1
13	10218.18	0.0012	5.13	94.0	17.6
14	5854.55	0.0029	5.02	97.9	18.6
15	8863.64	0.0041	5.39	96.7	28.0
16	9172.73	0.0023	5.58	98.4	22.7
17	7281.82	0.0033	5.33	97.0	35.6
18	4381.82	0.0020	5.1	98.5	13.1
19	1727.27	0.0006	5.33	11.8	3.3
20	7445.45	0.0026	5.49	97.9	19.4
21	7727.27	0.0019	5.17	98.5	20.5
22	1409.09	0.0008	5.1	97.0	6.8
23	1927.27	0.0006	5.08	48.6	12.4
24	2036.36	0.0007	5.18	97.9	6.4
25	1600.00	0.0022	5.09	95.8	11.3
26	3527.27	0.0015	5.02	96.7	8.3
27	3609.09	0.0008	5.28	22.3	8.0
28	7345.45	0.0031	5.28	97.3	24.2
29	4218.18	0.0024	5.28	96.3	17.0
30	9418.18	0.0019	5.66	97.2	28.8
31	4745.45	0.0007	5.28	96.5	18.7
32	5800.00	0.0031	5.26	89.9	17.7
33	7563.64	0.0033	5.19	94.6	24.0

En la tabla 3-6 se presentan las máximas producciones de biogás obtenidas para cada combinación de solución amortiguadora y cepa. Se puede observar que la cepa IR3::LacZ produjo más biogás que la cepa B10::LacZ. En su máximo, 1.4 veces más para la solución amortiguadora fosfato y 1.8 veces más para la Kolthoff.

Tabla 3-6 Intervalo de respuesta para experimentos con suero sintético - *Rhodobacter capsulatus* **IR3::LacZ y B10::LacZ**

	B10::LacZ		**IR3::LacZ**	
	Fosfato	**Kolthoff**	**Fosfato**	**Kolthoff**
	Max	Max	Max	Max
Producción de Biogas (ml L^{-1})	6.182	5.946	9.127	10.746
Productividad (ml h^{-1} L^{-1})	29,2	32,1	24,1	28,4
Tf (h)	212	185	378	378
T0 (h)	28	28	31	41
Lactosa consumida	77	64	82	95
% Lactato consumido	66	15	26	-17

El tiempo promedio de incubación y crecimiento de la bacteria en el medio antes del inicio de la producción de hidrógeno (T0) fue de 28 horas para la cepa B10:LacZ con ambas soluciones amortiguadoras. Para la cepa IR3::LacZ con solución fosfato el tiempo fue de 31 horas mientras con la solución Kolthoff fue de 41 horas. Como se puede observar existe una diferencia de 10 horas entre los experimentos de IR3::LacZ con solución Kolthoff , esto indica que a la bacteria le cuesta más trabajo crecer en un medio con esta solución amortiguadora pero así mismo con esta solución y esta cepa se reportaron los mejores valores de producción de biogás. Los tiempos de crecimiento reportados para estudios con este tipo de bacterias varían entre 5 y 72 horas, dependiendo del sustrato utilizado, los menores periodos se reportan para glucosa como fuente de carbono [69,82,134]. Para este estudio los tiempos de inicio de producción son consecuencia de que el inoculo de la bacteria se hizo en un medio con lactato como única fuente de carbono, debido a esto la bacteria requirió un periodo de adaptación para utilizar la lactosa como sustrato.

Para los experimentos en los cuales se presentó la mejor producción de hidrógeno (tabla3-6), el tiempo total de producción (Tf) para la cepa B10:LacZ fue de 212 y 185 horas para la solución fosfato y Kolthoff respectivamente. Para la cepa IR3::LacZ fueron 378 horas para ambas soluciones amortiguadoras. Como se puede observar, el tiempo total de producción de hidrógeno es menor para la cepa B10::LacZ. (Anexo D, tablas D1, D2, D3 y D4) por lo cual las productividades de los experimentos con esta cepa son iguales o

mayores que los de la cepa IR3::LacZ. Sin embargo, la producción total es menor. La cepa IR3 produjo más biogás, pero al mismo tiempo le tomó más tiempo hacerlo, por lo tanto, la productividad volumétrica de ambas es muy similar. El pH final no varía significativamente entre los diferentes grupos de experimentos y se encuentra entre 4 y 5.

Sobre el consumo de lactosa, se puede observar que hubo una mejora para ambas cepas respecto a los estudios realizados en el pasado en el grupo de investigación donde el consumo era solo del 40%. Sin embargo, respecto al lactato se observa que los consumos fueron bajos e incluso en algunos experimentos se observó una concentración mayor de este compuesto al final, lo cual indica que la bacteria lo está produciendo como parte de su metabolismo.

3.3.1 Modelo para producción de hidrógeno con suero sintético

Se estableció un modelo matemático utilizando la herramienta estadística *Design Expert,* para relacionar las cinco variables y la producción de biogás que ajustó adecuadamente a las ecuaciones 1A, 1B, 2A y 2B.

Ecuación 1 Ecuación modelo suero sintético para *Rhodobacter capsulatus* cepa B10::LacZ solución amortiguadora A-Fosfato, B-Kolthoff

***Rhodobacter capsulatus* B10::LacZ**				
A. Fosfato			**B. Kolthoff**	
Biogás ($ml\ L^{-1}$)	=		**Biogás ($ml\ L^{-1}$)**	=
-6482.47			8677.54	
627.34	* pH inicial		-488.01	* pH inicial
23378.26	* [Lactosa]		-63402.77	* [Lactosa]
-120.43	* [Lactato]		257.93	* [Lactato]
-267.72	* [Glutamato]		-487.82	* [Glutamato]
1.02	* Int. Lumínica		0.06	* Int. Lumínica
79.82	* pH inicial * [Lactato]		36.31	* pH inicial * [Glutamato]
-0.10	* pH inicial * Int. Lumínica		-1024.16	* [Lactosa] * [Lactato]
-703.63	* [Lactosa] * [Lactato]		0.67	* [Lactosa] * Int. Lumínica
-582.46	* [Lactosa] * [Glutamato]		1.43	* [Lactato] * [Glutamato]
1.59	* [Lactato] * [Glutamato]		0.00	* [Glutamato] * Int. Lumínica
-11.00	* $[Lactato]^2$		270267.91	* $[Lactosa]^2$
5.67	* $[Glutamato]^2$		-3.65	* $[Lactato]^2$
-8.15E-06	* Int. $Lumínica^2$		3.17	* $[Glutamato]^2$
			-4.90E-06	* Int. $Lumínica^2$

En el caso de la cepa B10::LacZ (ecuación 1) se utilizó, para ambas soluciones amortiguadoras, un modelo cuadrático, sin transformación de la respuesta.

Para la cepa IR3::LacZ, (ecuación 2) se utilizó también es un modelo cuadrático para ambas soluciones amortiguadoras. En este caso con una transformación de raíz cuadrada para la respuesta.

Para evaluar los modelos obtenidos se aplicó un análisis de varianza ANOVA. Los resultados generales se presentan en la tabla 3-7.

Ecuación 2 Ecuación modelo suero sintético para *Rhodobacter capsulatus* cepa IR3::LacZ solución amortiguadora A-Fosfato, B-Kolthoff

***Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ**			
A. Fosfato		**B. Kolthoff**	
$\sqrt{\textbf{Biogás}\ (\mathrm{ml\ L^{-1}})}$	=	$\sqrt{\textbf{Biogás}\ (\mathrm{ml\ L^{-1}})}$	=
-1.59E+03		-8.06E+01	
+4.24E+02	* pH inicial	+9.44E+00	* pH inicial
+2.20E+02	* [Lactosa]	+1.90E+02	* [Lactosa]
+1.06E+01	* [Lactato]	-7.33E+00	* [Lactato]
-1.18E-01	* [Glutamato]	+7.19E+00	* [Glutamato]
+1.28E-03	* Int. Lumínica	+8.98E-03	* Int. Lumínica
-9.96E-01	* pH inicial * [Lactato]	+9.43E-01	* pH inicial * [Lactato]
-8.02E-03	* [Lactosa] * Int. Lumínica	-9.95E-01	* pH inicial * [Glutamato]o
+1.44E-02	* [Lactato] * [Glutamato]	+3.58E+00	* [Lactosa] * [Glutamato]
-2.15E-05	* [Lactato] * Int. Lumínica	-7.94E-03	* [Lactosa] * Int. Lumínica
-2.78E+01	* pH inicial^2	-4.81E-05	* [Lactato] * Int. Lumínica
-7.66E-02	* [Lactato]^2	+4.54E-02	* [Lactato]^2
		-2.06E-07	* Int. Lumínica^2

Con los valores p obtenidos tanto para el modelo como para la falta de ajuste se puede decir que existe una correlación adecuada del modelo entre las variables de proceso y la respuesta. Se puede observar en el análisis Anova que el coeficiente R^2 para los modelos muestra un buen ajuste, ya que en todos los casos supera 0.90. Adicionalmente, el R^2 ajustado es aceptable ya que es superior al límite mínimo de 0,85.

El coeficiente de variación (CV %) en el caso de los modelos de la cepa B10::LacZ indica precisión aceptable, mientras que para la cepa IR3::LacZ los modelos tienen una precisión buena. Adicionalmente se realizó la verificación estadística de los modelos mediante el análisis de distribución de las gráficas residuales (ver Anexo F) y se concluyó que los modelos eran adecuados.

Tabla 3-7 Análisis ANOVA de los modelos con suero sintético *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ y B10::LacZ

	Rhodobacter capsulatus			
	B10::LacZ		**IR3::LacZ**	
	Fosfato	**Kolthoff**	**Fosfato**	**Kolthoff**
Modelo (valor p)	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Falta de ajuste (valor p)	0.23	0.33	0.22	0.50
C.V. %	22.19	19.92	6.81	9.36
R^2	0.92	0.94	0.92	0.93
R^2 Ajustado	0.88	0.90	0.88	0.88
R^2 Previsto	0.75	0.71	0.81	0.80

Posteriormente, se realizó una reducción de términos del modelo eliminando los no significativos, es decir aquellas variables que no tienen una influencia significativa sobre la respuesta. En el Anexo E se presentan las tablas con los resultados detallados. Valores de p menores de 0.05 indican que los términos son significativos para el modelo, entre 0.05 y 0.1 es a discreción del investigador determinar la relevancia del término. Sin embargo, en algunos casos a pesar de que estadísticamente hay términos que no son significativos, es necesario mantenerlos para soportar la jerarquía del modelo. Esto es lo que pasa cuando una variable principal no es significativa para el modelo, pero hay interacciones que la incluyen y son significativas.

Esto ocurre para todos los modelos con la variable intensidad lumínica y en 3 de los modelos para la variable pH inicial menos para B10::LacZ – Kolthoff. De acuerdo con los resultados entonces las variables pH inicial y/o la intensidad lumínica no son significativas. Este resultado difiere con otros estudios realizados para procesos de fotofermentación para los cuales tanto el pH como la intensidad lumínica influyen significativamente en la producción de biogás [104,137,138]. Sin embargo, estos estudios fueron realizados a condiciones de medio muy diferentes a las de este proyecto, con concentraciones de fuentes de carbono menores a 30 mM y concentraciones de fuente de nitrógeno inferiores a 10 mM, por lo cual no se puede hacer una comparación adecuada [135].

3.3.2 Análisis de la relación entre las variables y la producción de biogás

3.3.2.1Gráficos de cubo

Teniendo en cuenta el número de variables estudiadas en cada modelo y con el fin de conocer su comportamiento y especificar su influencia sobre la producción de hidrógeno se decidió utilizar el gráfico de cubo Figuras 3-1 y 3.2.

El principal objetivo del gráfico de cubo es evaluar el comportamiento de la respuesta (ml de biogás/l) al interrelacionar tres variables a la vez. Ya que se están estudiando cinco variables, este gráfico ayuda a reducir el número de gráficas necesarias para explicar el comportamiento general. Sin embargo, el gráfico de cubo tiene una limitación ya que solo se contemplan los valores extremos del intervalo de cada variable +1 y -1, razón por lo cual si el máximo de producción de biogás se encuentra en un valor intermedio de alguna variable no se podrá observar.

Teniendo en cuenta lo anterior se seleccionaron las variables cuyos valores óptimos correspondía a puntos extremos o cercanos a los extremos de los intervalos. En este caso se evalúan la concentración de lactosa, lactato y glutamato. Las otras dos variables pH inicial e intensidad lumínica están fijas en los valores de los puntos de validación calculados según el modelo.

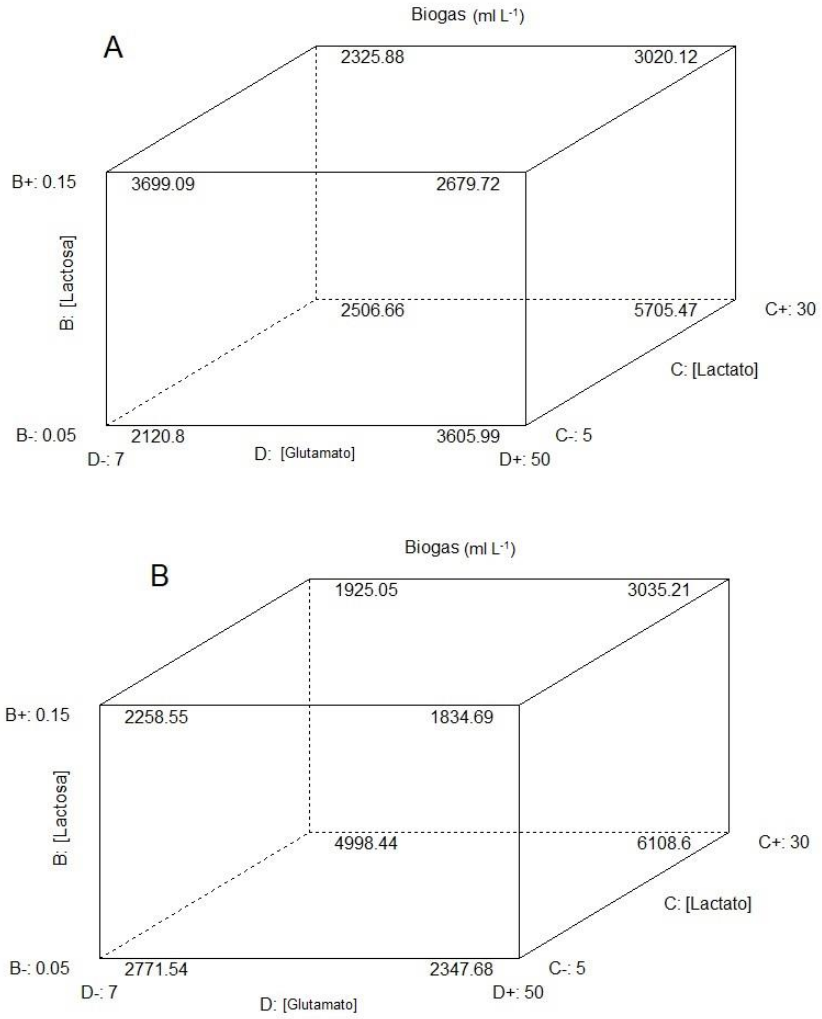
En la Figura 3-1 A se observa la gráfica de cubo para la cepa B10::LacZ con solución fosfato. Los valores de pH inicial e intensidad lumínica utilizados son en su orden 6.8 y 19000 lx. En este caso es posible observar que:

- Como tendencia general, la mayor producción de biogás se da a condiciones de: baja concentración de lactosa (0.05 M), alta concentración de glutamato (50 mM) y alta concentraciones de lactato (30 mM).

Existen excepciones a la tendencia general las cuales se deben a las interacciones entre las diferentes variables:

- La producción de biogás es mayor cuando la concentración de glutamato es mayor, menos en condiciones de alta concentración de lactosa (B+) y baja concentración de lactato (C-).
- La producción de biogás es mayor cuando la concentración de lactato es mayor, menos en condiciones de alta concentración de lactosa (B+) y baja concentración de glutamato (D-).

Figura 3-1 Gráficas de Cubo suero sintético *Rhodobacter capsulatus* cepa B10::LacZ
A. Fosfato y **B. Kolthoff**



Para la figura 3-1 B, cepa B10::LacZ con solución Kolthoff, los valores de pH inicial y de intensidad lumínica son 7.3 y 14000 lx. Para estas condiciones se puede observar que:

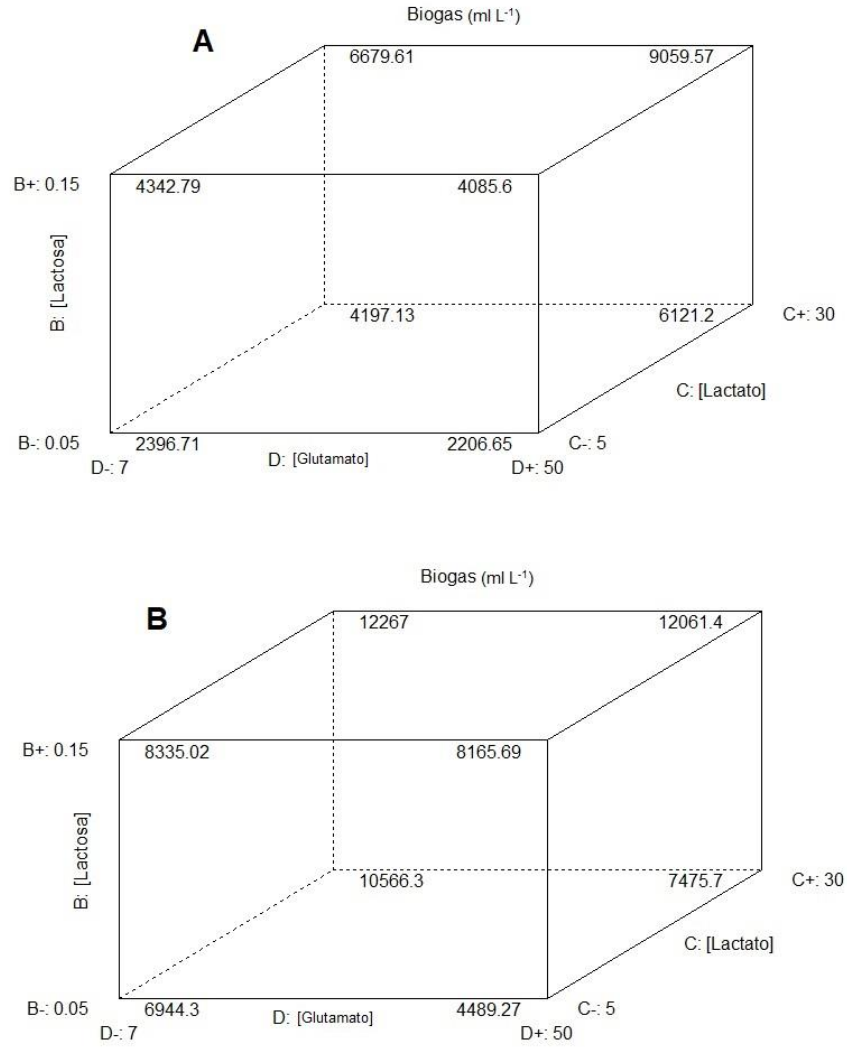
- Al igual que para la cepa B10::LacZ con solución fosfato, la máxima producción de biogás ocurre en las condiciones: baja concentración de lactosa (0.05 M), alta concentración de glutamato (50 mM) y alta concentraciones de lactato (30 mM).

Existen también excepciones:

- Hay mayor producción de biogás cuando la concentración de lactato es mayor, menos en condiciones de alta concentración de lactosa (B+) y baja concentración de glutamato (D-).

- Para concentraciones de lactato altas (C+), hay mayor producción de biogás cuando la concentración de glutamato es mayor (D+). Sin embargo, para concentraciones de lactato bajas (C-) el comportamiento es inverso.

Figura 3-2 Gráficas de Cubo suero sintético *Rhodobacter capsulatus* cepa IR3::LacZ **A. Fosfato** y **B. Kolthoff**



La figura 3-2A muestra los diagramas de cubo para la cepa IR3::LacZ solución fosfato, el pH inicial y la concentración lumínica son respectivamente 7.3 y 6300 lx. En este gráfico es posible observar que:

- La producción de biogás se favorece a mayores concentraciones de lactosa (B+), glutamato (D+) y lactato(C+).

- Para concentraciones bajas de lactato (C-) no existe una influencia significativa del glutamato sobre la producción de biogás. Para concentraciones altas de lactato (C+) se observa que la producción es mejor a mayor concentración de glutamato (D+).

Para la cepa IR3::LacZ, solución amortiguadora Kolthoff (figura 3-2B), el pH inicial y la concentración lumínica son respectivamente 7.8 y 17000 lx.
Para este modelo:

- Al igual que para la cepa IR3::LacZ – solución fosfato la mejor producción de biogás se presenta a: mayores concentraciones de lactosa (B+), glutamato (D+) y lactato(C+).
- A altas concentraciones de lactosa (B+) no existe una influencia significativa de la concentración de glutamato sobre la producción de biogás. Para bajas concentraciones de lactosa (B-) la producción es mayor a menor concentración de glutamato.

3.3.2.2 Graficas 3D superficie de respuesta

Estos gráficos son utilizados para complementar la información obtenida con los gráficos de cubos. La superficie de respuesta permite examinar con más detalle cómo es la influencia entre dos de las variables y su interacción. A diferencia del gráfico de cubo, la superficie de respuesta permite observar el comportamiento a lo largo de todo el intervalo de estudio y no solo en sus valores extremos.

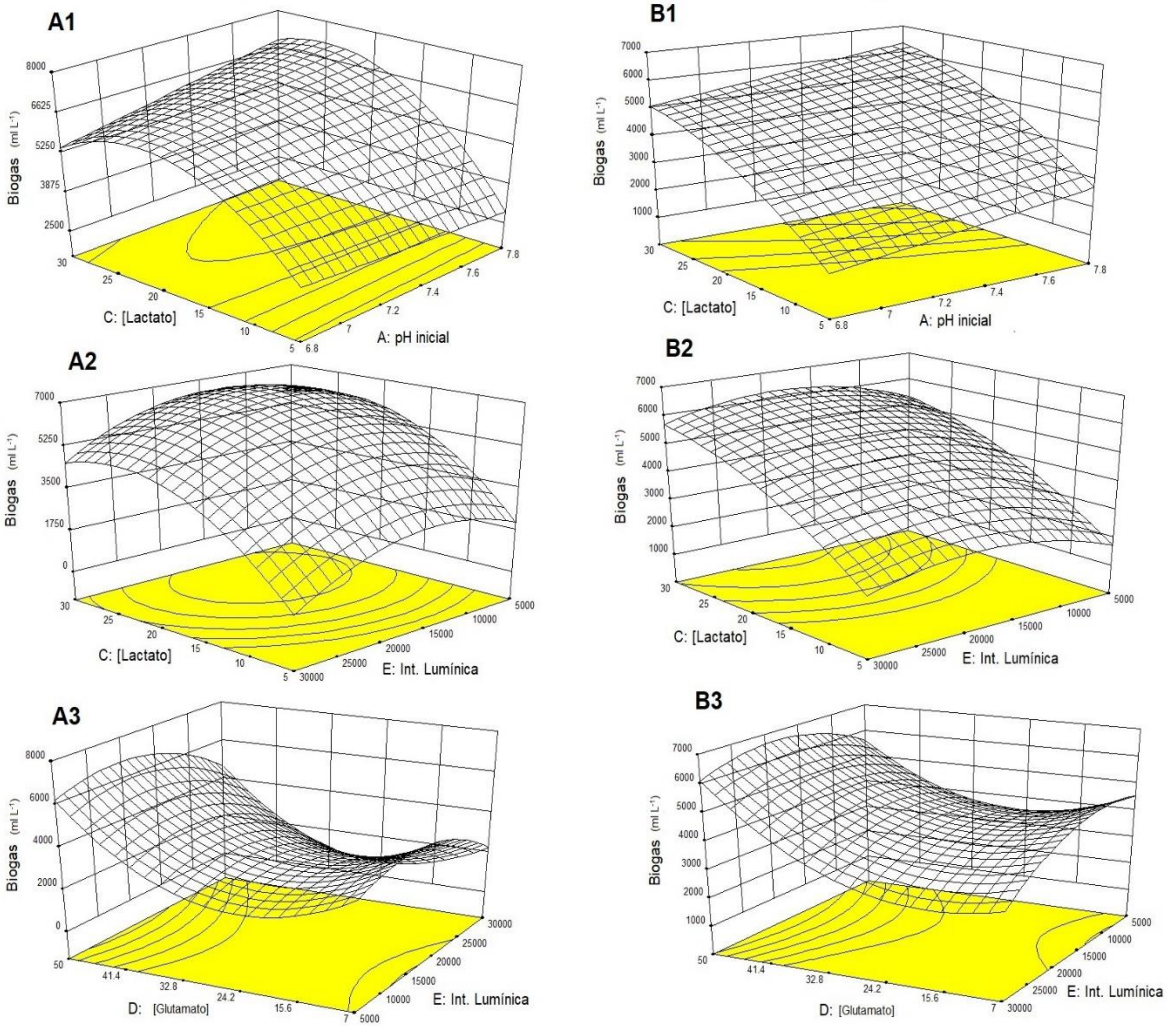
- **Cepa B10::LacZ con solución amortiguadora fosfato**

La superficie de respuesta tridimensional está representada en la figura 3-3 A. Las gráficas se generan a partir del modelo cuadrático obtenido (Ecuación 1-A). La concentración de lactosa que se tiene para estos gráficos es de 0.05 M. En estas gráficas se puede observar que:

- Existe un máximo de producción de biogás entre 20-25 mM de lactato para pH inicial 6.8. Para pH inicial de 7.8 la mayor producción de biogás no cambia significativamente a partir de 20 mM de lactato (A1).

- A concentraciones bajas de lactato no existe una influencia considerable del pH, pero a concentraciones altas la producción de biogás se ve influenciada positivamente por el pH, aumentando a medida que este aumenta (A1).
- La producción de biogás es mayor entre 15000 y 17000 lx (A2).
- La relación de la producción de biogás con las variables intensidad lumínica y concentración de glutamato (A3) se representa en forma de silla de montar. Los valores mínimos de producción se presentan a concentraciones de glutamato entre 15-30 mM. Las máximas producciones se presentan a 50 mM.

Figura 3-3 Gráficos 3D Superficie de Respuesta suero sintético - *Rhodobacter capsulatus* cepa B10::LacZ
A. Fosfato y B. Kolthoff



A: [Lactato] vs pH inicial, **B:** [Lactato] vs Intensidad lumínica **C:** Intensidad lumínica vs [Glutamato]

- **Cepa B10::LacZ con solución amortiguadora Kolthoff**

La superficie de respuesta tridimensional para la producción de biogás para este caso si observa en la Figura 3-3 B. Las gráficas se generan a partir del modelo cuadrático obtenido (Ecuación 1-B). La concentración de lactosa que se tiene para estos gráficos es de 0.05 M. En estas gráficas se puede observar que:

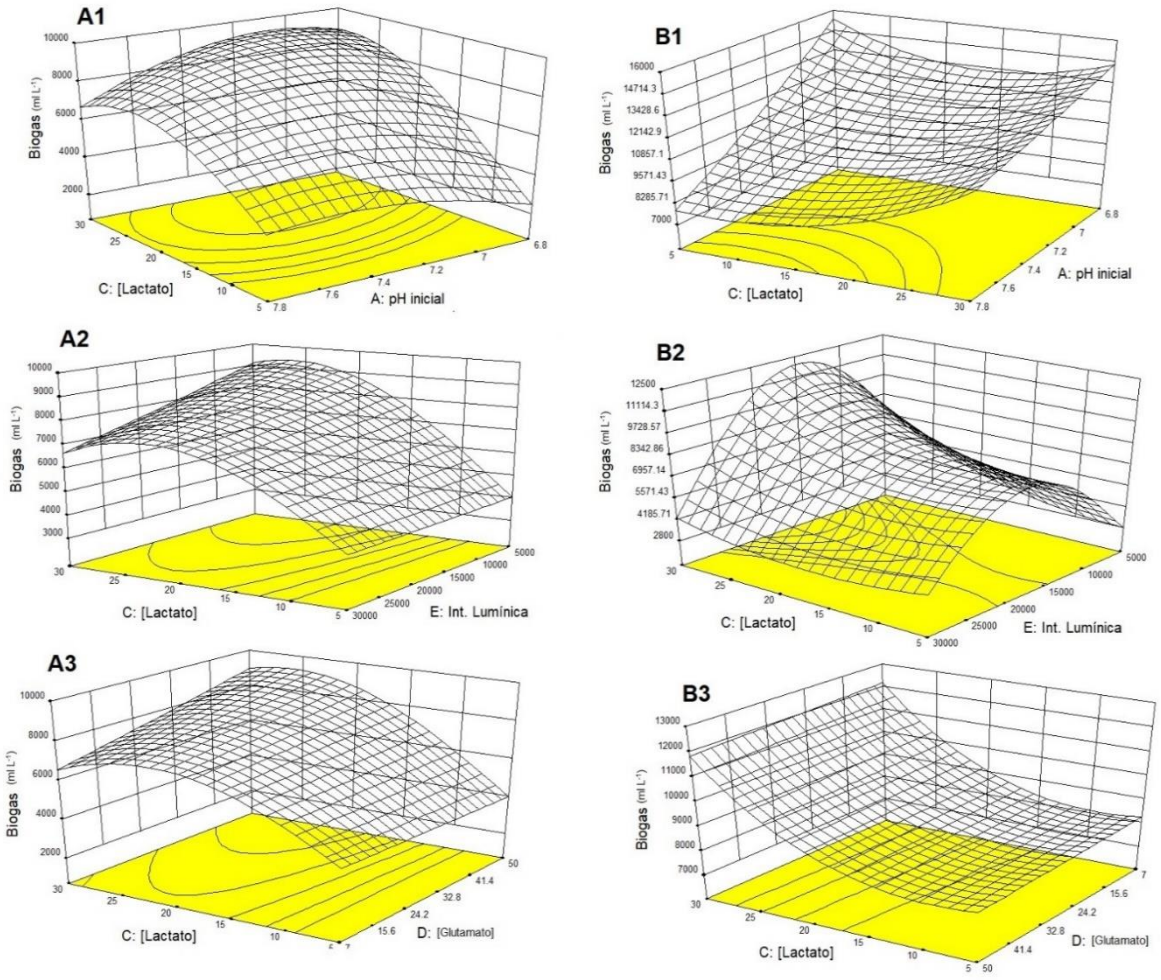
- La producción de biogás se ve influenciada positivamente por el pH, siendo directamente proporcional al aumento de este (B1).
- La producción de biogás tiene un máximo cerca de 17000 lx (B2).
- A concentraciones bajas de lactato, la influencia de la intensidad lumínica es más importante (B2).
- Al igual que en el modelo con fosfato, la relación de la producción de biogás con la intensidad lumínica y la concentración de glutamato (B3) se representa en forma de silla de montar. Los valores mínimos de producción son a concentraciones de glutamato entre 20-30 mM. Las máximas producciones se presentan a 50 mM.

- **Cepa IR3::LacZ con solución amortiguadora fosfato**

La superficie de respuesta tridimensional está representada en la Figura 3-4 A. Las gráficas se generan a partir del modelo cuadrático obtenido (Ecuación 2-A). La concentración de lactosa que se tiene para estos gráficos es de 0.15 M. En estas gráficas se puede observar que:

- La producción de biogás aumenta al aumentar la concentración de lactato. Sin embargo, a partir de 25 mM de lactato no hay un cambio significativo en la producción de biogás (A1).
- La producción aumenta al aumentar el pH hasta 7.3 donde hay un máximo de producción, a partir de este pH el aumento en la producción de biogás no es significativo (A1).
- La producción de biogás no se ve afectada por la intensidad lumínica a concentraciones bajas de lactato. Para concentraciones altas del mismo la producción aumenta a medida que la intensidad lumínica disminuye (A2).
- Para valores bajos de lactato no existe una influencia marcada de la concentración de glutamato. A valores altos de lactato la producción tiende a aumentar con la concentración de glutamato (A3).

Figura 3-4 Gráficos 3D Superficie de Respuesta suero sintético - *Rhodobacter capsulatus* cepa IR3::LacZ
A. Fosfato y B. Kolthoff



A:[Lactato] vs pH inicial, **B:** [Lactato] vs Intensidad lumínica **C:** [Lactato] vs [Glutamato]

- **Cepa IR3::LacZ con solución amortiguadora Kolthoff**

La superficie de respuesta está representada en la Figura 3-4 B. Las gráficas se generan a partir del modelo cuadrático obtenido (Ecuación 2-B). La concentración de lactosa que se tiene para estos gráficos es de 0.15 M. En estas gráficas se puede observar que:

- La producción de biogás se ve influenciada de forma inversa por el pH, aumentando a medida que este disminuye (B1).
- A pH inicial de 7.8 la producción es más alta a mayores concentraciones de lactato. Para pH 6.8 la producción tiende a disminuir entre 13-25 mM de lactato (B1).

- Al relacionar la producción de biogás con las variables intensidad lumínica y concentración de lactato (B2) su representación se da en forma de silla de montar. La mejor producción de biogás se da a una intensidad lumínica cerca de 17000 lx.
- No se observa una influencia importante de la concentración de glutamato sobre la respuesta (B3).

3.3.2.3Validación de modelo

Basándose en los modelos representados por las **Ecuaciones 1-A, 1-B, 2-A y 2B** se encontraron las condiciones para maximizar la producción de biogás. Los valores obtenidos son representativos en el área de estudio, cualquier extrapolación debe ser confirmada a través de experimentos adicionales.

Los puntos de validación se presentan a continuación en la Tabla 3-8.

Tabla 3-8 Puntos de validación de los modelos obtenidos con suero sintético

Modelo	pH	Lactosa (M)	Lactato (mM)	Glutamato (mM)	Luz (Lx)	Biogás (ml L^{-1}) Predicción
Cepa B10::LacZ/Fosfato	6.8	0.05	21	50	19000	6,444
Cepa B10::LacZ/Kolthoff	7.3	0.05	28	50	14000	5,998
Cepa IR3::LacZ/Fosfato	7.2	0.145	26	50	6000	9,369
Cepa IR3::LacZ/Kolthoff	7.8	0.146	28	50	17000	11,271

En la tabla 3-9 se observan los resultados obtenidos para los puntos de validación: la producción total de hidrógeno, los rendimientos producto/sustrato ($Y_{P/S}$) y la productividad volumétrica de hidrógeno. La última columna es el error obtenido respecto al valor de producción de hidrógeno predicho para cada modelo.

Tabla 3-9 Resultados de la validación de los modelos obtenidos para el suero sintético

Modelo	Producción (ml L^{-1})	Productividad (ml h^{-1} l^{-1})	$Y_{P/S}$ (mol H2 mol^{-1} sustrato)	Error modelo %
B10::LacZ - Fosfato	6564	35.48	3.24	1.857
B10::LacZ - Kolthoff	5982	32.33	2.74	0.270
IR3::LacZ - Fosfato	9409	64.01	2.08	0.428
IR3::LacZ - Kolthoff	11182	43.01	2.52	0.791

Los errores del modelo respecto a los resultados obtenidos son menores al 5% por lo tanto se puede decir que los modelos pueden representar adecuadamente el espacio de estudio de las variables y la producción de hidrógeno.

Respecto a los resultados se puede observar que la cepa B10::LacZ produjo menos biogás que IR3::LacZ. Además, las mejores producciones para esta cepa se dieron a la menor concentración de lactosa estudiada, 0.05M. Sin embargo, esto no indica que la bacteria se vea inhibida por la presencia de lactosa en el medio, en algunos experimentos realizados con concentración de lactosa de 0.15 M la bacteria (cepa B10::LacZ) consumió 95% de la lactosa pero esto no se vio reflejado en la producción de biogás. Esto muestra que la cepa B10::LacZ puede consumir la lactosa pero no la está utilizando para producir hidrógeno. En algunos estudios realizados previamente sobre el metabolismo de las BPNS como Tabita 2001 o Koku 2002 [139,140], se observa que estas bacterias pueden utilizar una amplia variedad de sustratos como fuente de carbono y nitrógeno. Además, existen varias rutas metabólicas que pueden utilizar, las cuales varía según la especie o las diferentes cepas de una misma especie. Las bacterias son sensibles a factores como la relación carbono/nitrógeno del medio, el estado de reducción del sustrato o la actividad del ciclo del ácido tricarboxílico y según las condiciones pueden producir metabolitos alternos, diferentes al hidrógeno, (como polisacáridos) que tengan la misma función de disipar el exceso de energía y el poder reductor [139,140]. Probablemente esto es lo que ocurre con la cepa B10::LacZ, las bacterias están produciendo y acumulando productos diferentes al hidrógeno. Una posible evidencia de este comportamiento se observa en la relación entre la densidad óptica y peso seco. Se obtuvo una correlación entre estos factores cuando se utilizó como sustrato lactato como única fuente de carbono (Anexo A), cuando se utilizó lactosa no fue posible encontrar una correlación mostrando que hay una variación en el crecimiento de la bacteria respecto al sustrato utilizado. Debido a los resultados obtenidos se puede decir que la cepa B10::LacZ en las condiciones que se estudian no favorece la producción de hidrógeno.

Para el caso de la cepa IR3::LacZ se observa que, si bien también hay alteraciones de la correlación del peso seco con la densidad óptica, lo cual podría indicar la formación de sustancias que son acumuladas por las bacterias, las condiciones estudiadas favorecen más la producción de hidrógeno, en comparación con la cepa B10::LacZ.

La variación en el pH también es un factor de interés. Para ningún modelo el pH se mantuvo cerca al valor inicial, todos los experimentos tuvieron un pH final entre 4 y 5. Esto indica que la solución amortiguadora no realiza su trabajo de control de pH, al menos no durante todo el tiempo que dura el experimento, aunque es posible que desacelere el descenso del pH.

Esta baja en el pH posiblemente se debe a la formación de ácidos orgánicos, en este caso láctico y acético, que las bacterias producen en un proceso de fermentación paralelo a la fotofermentación, los que se acumulan en el medio y bajan el pH. Este comportamiento se presentó también en estudios realizados por Pandey 2012 donde se evidenció la formación de lactato y polihexa butirato en procesos de fotofermentación [141]. La cepa B10::LacZ en promedio tiene un tiempo de producción total de la mitad comparado con la cepa IR3::LacZ, esto indicaría que posiblemente B10 produce estos ácidos a mayor velocidad por lo cual se ve inhibida más rápido.

Los resultados muestran que la cepa es la variable más importante, para la solución amortiguadora (fosfato) la cepa IR3::LacZ produjo 30% más biogás que la B10::LacZ, para la solución Kolthoff la cepa IR3::LacZ tuvo una producción 47% superior. Este resultado es similar al obtenido por He, Bultel, Magnin, Roux y Willinson [14], quienes compararon cuatro diferentes cepas de *Rhodobacter capsulatus* obteniendo que la cepa que produjo más hidrógeno fue IR3, al compararla con B10 la producción fue 45% superior.

Respecto a las condiciones en las cuales se maximiza la producción de biogás se observa que en todos los modelos, las mejores producciones se dan a concentraciones de lactato superiores a 20 mM y concentraciones de glutamato de 50 mM. El principal diferenciador es la concentración de lactosa, para B10::LacZ las mejores producciones se dan a concentraciones de lactosa de 0.05 M, mientras que para IR3::LacZ de 0.15 M. Esta diferencia es crítica para la selección de la cepa de trabajo ya que el objetivo es utilizar suero de leche industrial como medio de cultivo para la producción de hidrógeno y este posee una alta concentración de lactosa. Por este motivo se decidió trabajar con la cepa IR3::LacZ en las etapas posteriores.

Al comparar los resultados obtenidos en esta etapa con los rendimientos y productividades de otros estudios realizados para fotofermentación, tabla 1-3, se puede observar que existe

un aumento en la productividad. Los rendimientos producto-sustrato son similares [81,83] e incluso superiores en algunos casos [79,80].

Los resultados obtenidos con suero sintético permiten inferir que el suero de leche puede ser utilizado para la producción biológica de hidrogeno mediante el proceso de fotofermentación de la bacteria recombinada *Rhodobacter capsulatus.*

3.4 Conclusiones y recomendaciones

3.4.1 Conclusiones

- El estudio de las modificaciones fisicoquímica, como son la concentración de fuente de carbono, fuente de nitrógeno, el pH inicial y la intensidad lumínica, en los medios de crecimiento de la bacteria *Rhodobacter capsulatus* cepas B10::LacZ e IR3::LacZ, condujo a mejoras en la producción de hidrógeno. La mejor producción de hidrogeno obtenida fue el doble que la presentada en etapas preliminares el proyecto[81].
- Fue posible representar adecuadamente mediante modelos el efecto de las variables estudiadas sobre la producción de hidrógeno en reactores *por lotes*. Mediante estos se pudieron encontrar las mejores condiciones que favorecen la producción de hidrógeno.
- La solución amortiguadora Kolthoff puede reemplazar la solución amortiguadora tradicional (fosfato) utilizada en el medio de cultivo de la bacteria *Rhodobacter capsulatus.* En el caso de la cepa IR3::LacZ el uso de esta solución incrementó la producción de hidrógeno en 17%.
- De las cepas estudiadas, IR3::LacZ es la apta para realizar los experimentos con suero de leche industrial.
- Las variables más relevantes para el proceso de producción de hidrógeno son la cepa y concentración de lactosa.
- Se encontraron puntos óptimos de producción de hidrógeno unos de los cuales son:
    - Para **B10::LacZ con solución fosfato**: [Lactosa]: 0.05 M, [Lactato]: 21 mM, [Glutamato] : 50 mM, Intensidad lumínica: 19000 lx y pH inicial: 6.8.
    - Para **B10::LacZ con solución Kolthoff**: [Lactosa]: 0.05 M, [Lactato]: 28 mM, [Glutamato] : 50 mM, Intensidad lumínica: 14000 lx y pH inicial: 7.3.

- Para **IR3::LacZ con solución fosfato**: [Lactosa]: 0.15 M, [Lactato]: 21 mM, [Glutamato] : 50 mM, Intensidad lumínica: 6000 lx y pH inicial: 7.2.
- Para **IR3::LacZ con solución Kolthoff**: [Lactosa]: 0.15 M, [Lactato]: 21 mM, [Glutamato] : 50 mM, Intensidad lumínica: 17000 lx y pH inicial: 7.8.

4. Producción de hidrógeno con *Rhodobacter capsulatus cepa IR3::LacZ* en suero de leche industrial

En esta etapa del proyecto se utilizó suero de leche industrial como sustrato en la producción biológica de hidrógeno. Fue necesario realizar al lactosuero un pretratamiento de tres etapas: eliminación de grasa, desproteinización y pasteurización. Posteriormente este suero tratado fue utilizado para estudiar la influencia de cuatro variables, tres continuas: concentración de suero leche (50–90% (v/v)), concentración de molibdeno (5-50 µM) e intensidad lumínica (8000 – 30000 lx) y una variable discreta: solución amortiguadora (Kolthoff – Fosfato). Utilizando la metodología de superficie de respuesta fue posible obtener un modelo que describe la producción de hidrógeno con solución amortiguadora de fosfato. Con esta solución amortiguadora se obtuvo mayores producciones de hidrógeno con concentraciones de suero de 90%. Por otra parte, se comprobó que la adición de una etapa de homofermentación mejoró la producción de hidrógeno, obteniendo mayores productividades y eficiencias.

In this stage was used industrial whey as substrate in the biological production of hydrogen. It was necessary to carry out a three-stage pretreatment to the cheese whey: fat removal, deproteinization and pasteurization. This pretreated whey was used to study the influence of four variables, three continuous: whey concentration (50-90%v/ v), molybdenum concentration (5-50 µM) and light intensity (8000 - 30000 lx) and a discrete variable: Buffer (Kolthoff - Phosphate). The Response Surface methodology was used to obtain a model that describes the production of hydrogen for phosphate buffer. A higher production of hydrogen was obtained with concentrations of 90% of whey. Besides, it was found that the addition of a homofermentation stage to the pretreatment improved the production of hydrogen, obtaining higher productivities and efficiencies.

4.1 Introducción

El suero de leche es un subproducto de la industria láctea generado en el proceso de fabricación del queso. Los residuos industriales de este sector presentan una carga orgánica importante con un índice de biodegradabilidad (DBO_5/DQO) entre 0.4-0.8. Los valores elevados de este índice se deben principalmente a la presencia de altas concentraciones de carbohidratos y proteínas como la lactosa y la caseína [142].
Anteriormente, el lactosuero era desechado en el ambiente sin ningún tratamiento previo ya fuera en suelos o diferentes cuerpos de agua [99]. Entre los principales efectos nocivos que causa este residuo sobre el medio ambiente se encuentran: exceso de consumo de oxígeno, impermeabilización, eutrofización y toxicidad [99]. Debido a esto actualmente se contemplan otras opciones para disponer de este residuo entre las cuales resaltan: la aplicación de tecnologías de valorización para extraer compuestos de interés del suero como la lactosa y las proteínas [110], la aplicación de tratamientos biológicos que buscan valorizar el suero utilizándolo para producir otros compuestos con mayor valor agregado [111] o la aplicación de tratamientos fisicoquímicos como deshidratación [99,115,142,143].

En este proyecto, se busca reducir la carga orgánica del suero utilizando la lactosa para obtener un biogás rico en hidrógeno mediante un proceso de fotofermentación realizado por la BPNS *Rhodobacter capsulatus*. Con el fin de utilizar el suero de leche en el proceso de fotofermentación es necesario realizar ciertas adaptaciones para que la bacteria pueda producir hidrógeno con este sustrato. El pretratamiento del suero de leche debe contemplar los procesos de [81]:
-Desproteinización: para reducir la concentración de proteína en el medio.
-Reducción del contenido graso: Con el fin de homogenizar el medio.
-Suplementación: con sales que la bacteria requiere
-Esterilización.
Adicionalmente, se plantea la adición de una etapa de homofermentación que busca aumentar la concentración de ácido láctico presente en el suero. A partir de estudios previos del grupo de investigación se sabe que *Rhodobacter capsulatus* cepa IR3 produce hidrógeno en un proceso fotofermentativo a partir de ácido láctico[38,89]. Por esta razón se espera que al implementar una etapa adicional de homofermentación la bacteria fotosintética pueda aprovechar este sustrato y así mejorar el rendimiento del proceso.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Microorganismo y medio

El microorganismo utilizado fue la cepa recombinada de la bacteria *Rhodobacter capsulatus*, IR3::LacZ.

La presencia de esta recombinación es útil para el proyecto ya que le permite a la bacteria utilizar la lactosa como sustrato y el suero de leche industrial posee una cantidad importante de este azúcar [121].

El medio de crecimiento de la bacteria es el medio RCV descrito con anterioridad al igual que el procedimiento para preparar el inóculo. (ver secciones 2.2.1 y 2.2.2)

4.2.2 Suero de Leche y Pretratamiento

Se utilizó suero en polvo del mismo lote durante todo el proyecto. El suero fue comprado a la empresa CIMPA s.a.s en Colombia. La composición de este suero se muestra en la tabla 4-1. La reconstitución del suero se dio según especificaciones del proveedor 1 kg de suero por 9 L de H_2O destilada y desionizada. El suero reconstituido tiene una concentración promedio de lactosa de 0.2M, lactato 35mM, proteína 9 g L^{-1} y un pH inicial de 6.3.

Tabla 4-1 Composición del lactosuero de trabajo

Composición (polvo) %	
Humedad	4.30
Cenizas	7.08
Lactosa	64.82
Proteína	10.30
Grasa	2.82
Minerales (mg kg^{-1})	
Sodio	8183,0
Potasio	7484,5
Calcio	13116,0
Magnesio	626,5
Hiero	29.6

A continuación, se explican los pretratamientos que se realizaron al suero de leche para ser utilizado como sustrato en el proceso de producción de hidrógeno (Figura 4-1).

4.2.2.1 Reducción de contenido graso

Esta remoción es esencial pues la grasa es un agente de saturación en el suero el cual limita la homogenización del medio y el posible aprovechamiento de los nutrientes por parte de microorganismo [144]. La metodología utilizada fue la centrifugación, acompañada de ajuste de pH lo cual facilita el proceso. Las condiciones utilizadas para este pretratamiento son las siguientes: temperatura 80°C, pH 4.0, centrifugación 8500 rpm por 15 minutos [144–147]. Posteriormente se realizó una filtración cualitativa (filtro de celulosa).

4.2.2.2 Desproteinización

El suero de leche tiene una alta concentración de proteína alrededor de 8.0- 10.0 g L^{-1}; es necesario reducir esta concentración con el fin de activar la ruta metabólica requerida para la producción de hidrogeno. (bajas concentraciones de fuente nitrogenada para la activación de la nitrogenasa)

El método de desproteinización seleccionado fue la precipitación de proteínas mediante alteraciones en las condiciones del medio para desnaturalizarlas y posteriormente separarlas del suero mediante centrifugación y filtración. La desnaturalización de las proteínas se logra manipulando temperatura y pH. Para determinar las condiciones más adecuadas para llevar a cabo el proceso de desproteinización del suero se realizó un pequeño diseño de experimentos en el cual se analizaron estas dos variables Estos experimentos se encuentras explicados más detalladamente en el Anexo G. El mayor porcentaje de desproteinización alcanzado fue alrededor de 70%, con un contenido final de proteína de 3.6 g L^{-1}.

Con estos resultados se escogió un proceso de desproteinización con las siguientes condiciones: temperatura de 100°C, pH 4.0 y tiempo 10 minutos. Después de someter el suero a estas condiciones se pone en reposo a 4°C por 24 horas y posteriormente se centrifuga a 8500 rpm por 5 minutos y se separa el sobrenadante. Posteriormente se realizó una filtración cualitativa (filtro de celulosa).

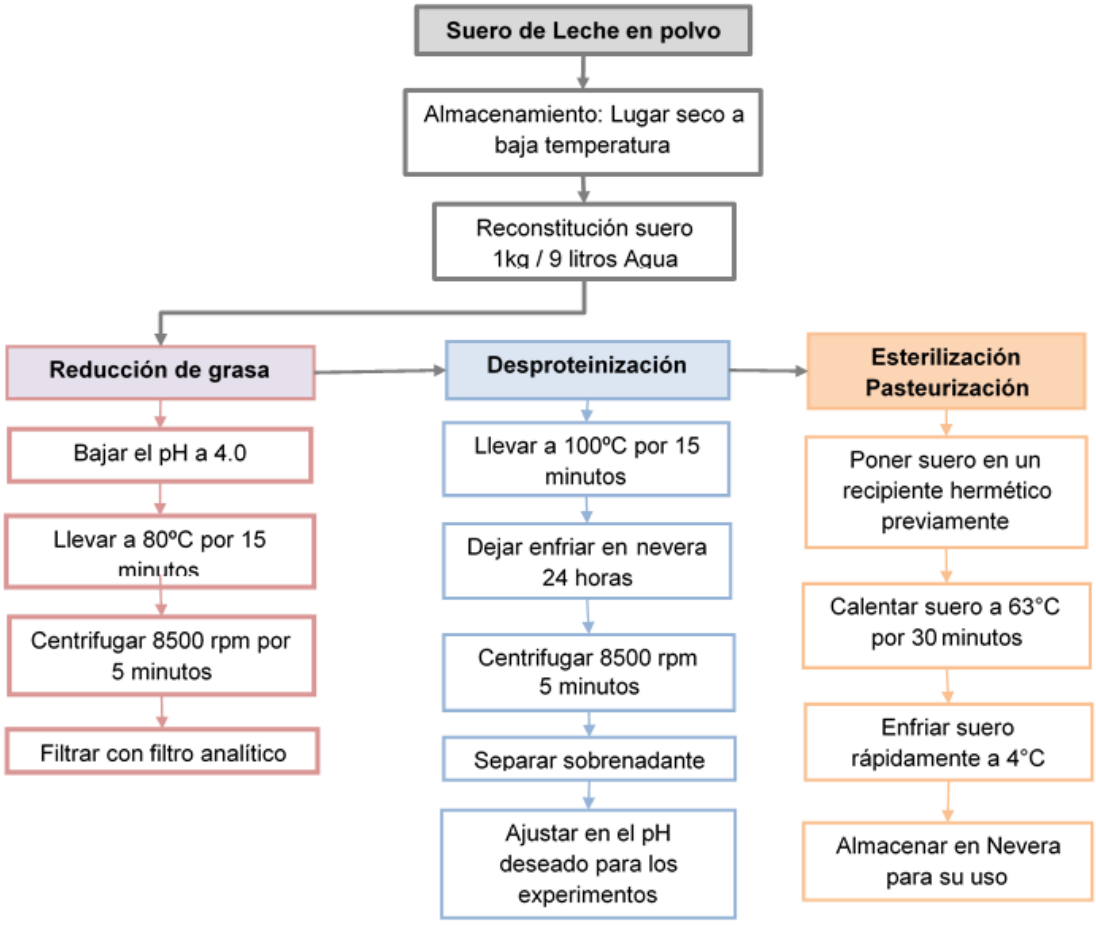
4.2.2.3 Pasteurización

Para la esterilización del medio inicialmente se realizó microfiltración con membranas de 0.22 µm. El suero filtrado fue almacenado en recipientes herméticos esterilizados previamente en una autoclave por 15 minutos a 22 psi. Finalmente, el suero fue colocado en refrigeración a 4ºC previo a su uso.

Sin embargo, la microfiltración resultó ser un método complicado debido a que el suero por su composición es extremadamente difícil de filtrar. Los tiempos para este proceso superaban las 3 horas para filtrar 1 litro de suero. Por esta razón, se decidió utilizar el proceso de pasteurización VAT.

La pasteurización VAT se lleva a cabo en un recipiente hermético cerrado, previamente esterilizado en autoclave. En este recipiente se agrega el suero y se calienta a una temperatura de 63 °C por un tiempo de mínimo 30 minutos. A continuación, se enfría el recipiente rápidamente a una temperatura de 4°C y se almacena en la nevera.

Figura 4-1 Pretratamiento para el suero de leche



4.2.3 Experimentos por lotes

Los experimentos se realizaron en reactores cuadrados de vidrio de 125 ml herméticos, cerrados con un tapón de caucho. Estos reactores contaban con un agitador magnético para mezclar el medio y se llenaron con un volumen total de 110 ml. Se adicionaron a los reactores las sales, la solución amortiguadora y el agua, junto con el agitador magnético y se esterilizaron en una autoclave por 15 minutos a 22 psi. Posteriormente se adicionó el suero de leche pasteurizado.

Los reactores se ubicaron en una cámara termorregulada en 30°C que cuenta con una bombilla de sodio ubicada en el medio como fuente lumínica. El biogás fue captado y medido mediante un sistema basado en el desplazamiento de volumen. Tanto el sistema de captación de biogás, como la cámara utilizada se describen con más detalle en la sección 2.3.

4.2.4 Diseño de experimentos con suero de leche industrial

Las variables estudiadas fueron la concentración de lactosuero, concentración de molibdeno, y la intensidad lumínica. Estas variables y sus intervalos de estudio se seleccionaron de acuerdo con experiencias previas en el equipo de investigación y en el presente proyecto. Al igual que en la etapa anterior se utilizó la metodología de superficie de respuesta, modelo centrado en la cara para analizar la influencia de las variables sobre la producción de hidrógeno. Utilizando el software estadístico *Design Expert* 8.0 (*Stat Ease*, Minneapolis, USA) se obtuvo una matriz con 15 experimentos (Tabla 4-2) para el estudio de las tres variables continúas mencionadas anteriormente, los experimentos se realizaron para las dos soluciones amortiguadoras, estándar fosfato K_2HPO_4/KH_2PO_4 y Kolthoff $KH_2PO_4/Na_2B_4O_7.10H_2O$, para un total de 30 experimentos.

- **A: Concentración de suero de leche (% (v/v)):**

Se evaluó la concentración de suero en cada reactor con el fin de determinar con cual se producía más hidrógeno. El intervalo de estudio se determinó según las concentraciones estudiadas en el suero sintético. Como que el suero tiene una concentración de lactosa de 0.2 M, se trabajó con un intervalo de dilución del suero entre 90% y 50% (v/v), para ajustar las concentraciones de lactosa entre 0.18 M y 0.1 M respectivamente. A estas diluciones las concentraciones de ácido láctico y proteína están entre los intervalos 36-20 mM y 3.2 - 1.8 g L^{-1} respectivamente.

- **B: Concentración de molibdeno:**

El molibdeno es un cofactor de la nitrogenasa y un elemento indispensable para la producción de hidrógeno. Se decidió estudiar como variable ya que es necesario suplementarlo porque en el suero su concentración es insuficiente para la producción de hidrógeno. El intervalo de estudio fue 5-50 µM [148].

- **C: Intensidad lumínica**

En una fotofermentación es necesaria una fuente lumínica para que la bacteria lleve a cabo la fotosíntesis. Se varió la intensidad lumínica ajustando la proximidad a la bombilla de sodio. Se probaron intensidades en el intervalo de 5000-30000 lx.

- **Solución amortiguadora**

Debido a los resultados obtenidos con las pruebas de suero sintético se decidió evaluar las dos soluciones amortiguadoras: solución fosfato K_2HPO_4/KH_2PO_4 0.64 M [119] y solución de Kolthoff $KH_2PO_4/Na_2B_4O_7$ [122].

Tabla 4-2 Matriz de Experimentos para suero de leche industrial

Corrida	% Suero (v/v)	[Mo] µM	Intensidad Luz (lx)
1	70	27.5	17500
2	70	27.5	17500
3	70	27.5	30000
4	90	50	5000
5	90	5	30000
6	70	27.5	17500
7	90	27.5	17500
8	70	27.5	5000
9	70	50	17500
10	70	27.5	17500
11	70	27.5	17500
12	70	5	17500
13	50	50	30000
14	50	5	5000
15	50	27.5	17500

4.2.5 Procesamiento de muestras

Al finalizar los experimentos se realizaron análisis del medio final del reactor para determinar: pH, densidad óptica, peso seco y composición del medio.

La metodología de procesamiento de datos se encuentra descrita de forma más específica en la sección 2.5.

4.3 Resultados y Análisis Suero de leche industrial

Se midió la producción total de biogás expresada en mililitros. Este biogás es rico en hidrógeno, pero incluye el porcentaje de CO_2 el cual está presente en un valor no mayor de 25% (apartado 2.4.4). En las tablas 4-3 y 4-4 se presentan los resultados de los experimentos.

Tabla 4-3 Resultados Suero Industrial *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ (Kolthoff**)**

Corrida	Producción Biogás (ml L^{-1})	Peso Seco Medio final (g ml^{-1})	pH Final	Tiempo (h)	Productividad (ml h^{-1})
1	1381.82	0.0021	4.5	130	10.63
2	1600.00	0.0020	4.55	157	10.19
3	1054.55	0.0043	4.6	103	10.24
4	7236.36	0.0039	5.11	280	25.84
5	5745.45	0.0020	4.87	164	35.03
6	1527.27	0.0019	4.74	154	9.92
7	2236.36	0.0025	5.92	188	11.90
8	981.82	0.0035	4.48	103	9.53
9	5709.09	0.0027	4.39	217	26.31
10	4163.64	0.0023	4.59	217	19.19
11	7054.55	0.0026	4.8	199	35.45
12	1127.27	0.0023	4.68	106	10.63
13	1490.91	0.0018	4.44	106	14.07
14	1818.18	0.0020	4.6	148	12.29
15	2636.36	0.0044	4.62	130	20.28

Igual que en la etapa anterior, se evidenció en algunos experimentos, la formación de ácido láctico (Anexo D). Este ácido se produce en un proceso de fermentación realizado por la bacteria que ocurre paralelamente a la fotofermentación y que se ha evidenciado otros estudios [141].

Tabla 4-4 Resultados Suero Industrial *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ (Fosfato)

En la tabla 4-5 el panorama general de los valores mínimos y máximos obtenidos para las respuestas analizadas para cada grupo de experimentos.

Corrida	Producción Biogás (ml L^{-1})	Peso Seco (g ml^{-1})	pH Final	Tiempo (h)	Productividad (ml h^{-1})
1	5054.5	0.0053	4.17	116	43.57
2	5872.7	0.0038	4.13	191	30.75
3	3618.2	0.0050	4.58	146	24.78
4	11218.2	0.0038	5.01	310	36.19
5	9309.1	0.0019	4.43	262	35.53
6	4800.0	0.0036	4.13	200	24.00
7	9745.5	0.0051	4.42	314	31.04
8	7654.5	0.0043	4.96	197	38.86
9	5772.7	0.0035	4.52	211	27.36
10	4218.2	0.0035	4.76	211	19.99
11	6236.4	0.0045	4.33	131	47.61
12	4327.3	0.0033	4.21	90	48.08
13	5236.4	0.0050	4.31	131	39.97
14	3654.5	0.0038	4.4	125	29.24
15	4654.5	0.0048	4.33	218	21.35

Tabla 4-5 Máximos y mínimos de las variables estudiadas - Suero de leche industrial *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ

	Rhodobacter capsulatus **IR3::LacZ**			
	Fosfato		Kolthoff	
	Max	**Min**	**Max**	**Min**
Producción biogás (ml L^{-1})	11218.2	3618.2	7236.4	981.8
pH final	5.01	4.13	5.92	4.49
Tiempo (h)	314	90	280	103
Productividad (ml $h^{-1}L^{-1}$)	48.08	19.99	35.45	9.53

El tiempo promedio de incubación y crecimiento de la bacteria en el medio antes del inicio de la producción de hidrógeno fue de 31 horas para la solución amortiguadora fosfato y 78 horas para la solución Kolthoff. Esto indica que IR3::LacZ tiene mayor dificultad para crecer en el medio suero industrial con la presencia de la solución Kolthoff. Este resultado es

similar al obtenido para los experimentos con suero sintético. Sin embargo, en estos experimentos el tiempo de crecimiento fue 30 horas mayor al presentado en la etapa anterior (suero sintético). La dificultad del crecimiento en este medio se debe posiblemente a que el sustrato, suero de leche industrial, es una matriz más compleja de nutrientes. Por ejemplo, se utilizan como fuente de nitrógeno proteínas en vez de glutamato, además hay una mayor concentración de sales en el suero (tabla 4-1), esto sumado a la presencia de la solución Kolthoff dificulta el crecimiento de la bacteria y a su vez la producción de hidrógeno.

Los tiempos totales promedio de producción fueron 190 para la solución fosfato y 160 para Kolthoff (Anexo D). Esta gran diferencia en los tiempos y en la producción total de biogás, hace que la productividad volumétrica de los experimentos con la solución fosfato sea mayor.

4.3.1 Análisis Estadístico

Los experimentos realizados con la solución amortiguadora fosfato se utilizaron para establecer un modelo matemático que permitió determinar cuáles variables, o sus interacciones, tiene una influencia significativa sobre la producción de biogás y encontrar las condiciones con las cuales se produce mayor cantidad de hidrógeno. Utilizando la herramienta estadística *Design Expert* se encontró que la relación entre los tres parámetros y la producción de biogás ajustó adecuadamente al modelo que se representan en la ecuación 3.

Ecuación 3 Modelo para producción de biogás con suero industrial *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ (Fosfato)

Biogás (ml L^{-1}) =	
21486.7	
-556.8	* [Suero]
-20.1	* [Molibdeno]
-1.9E-01	* Int. Lumínica
4.4E-03	*[Molibdeno] * Int. Lumínica
5.1	* $[Suero]^2$

En el caso de la cepa IR3::LacZ con solución fosfato, se utilizó un modelo cuadrático sin transformación de la respuesta.

Se aplicó el análisis de varianza ANOVA para evaluar el modelo obtenido y determinar si es significativo o no. Los resultados generales se presentan en la tabla 4-6.

Tabla 4-6 Análisis ANOVA Suero industrial - *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ (Fosfato)

Modelo (valor p)	< 0.0001
Falta de ajuste (valor p)	0.84
C.V. %	7.92
R^2	0.96
R^2 Ajustado	0.94
R^2 Previsto	0.90

Con los valores de p obtenidos para el modelo y la falta de ajuste se puede decir que el modelo es significativo y la falta de ajuste no es significativa, lo que implica que existe una correlación adecuada del modelo entre las variables de proceso y las respuestas. Se puede observar en el análisis Anova un buen ajuste del modelo porque el coeficiente R^2 es 0.96. Adicionalmente, el R^2 ajustado es aceptable ya que es superior al límite mínimo 0.85 y el coeficiente de variación (CV %) menor a 10% indica una precisión buena.

Se realizó una reducción de términos del modelo eliminando los no significativos con los mismos criterios con que se realizó en la etapa anterior (ver apartado 3.3.1).

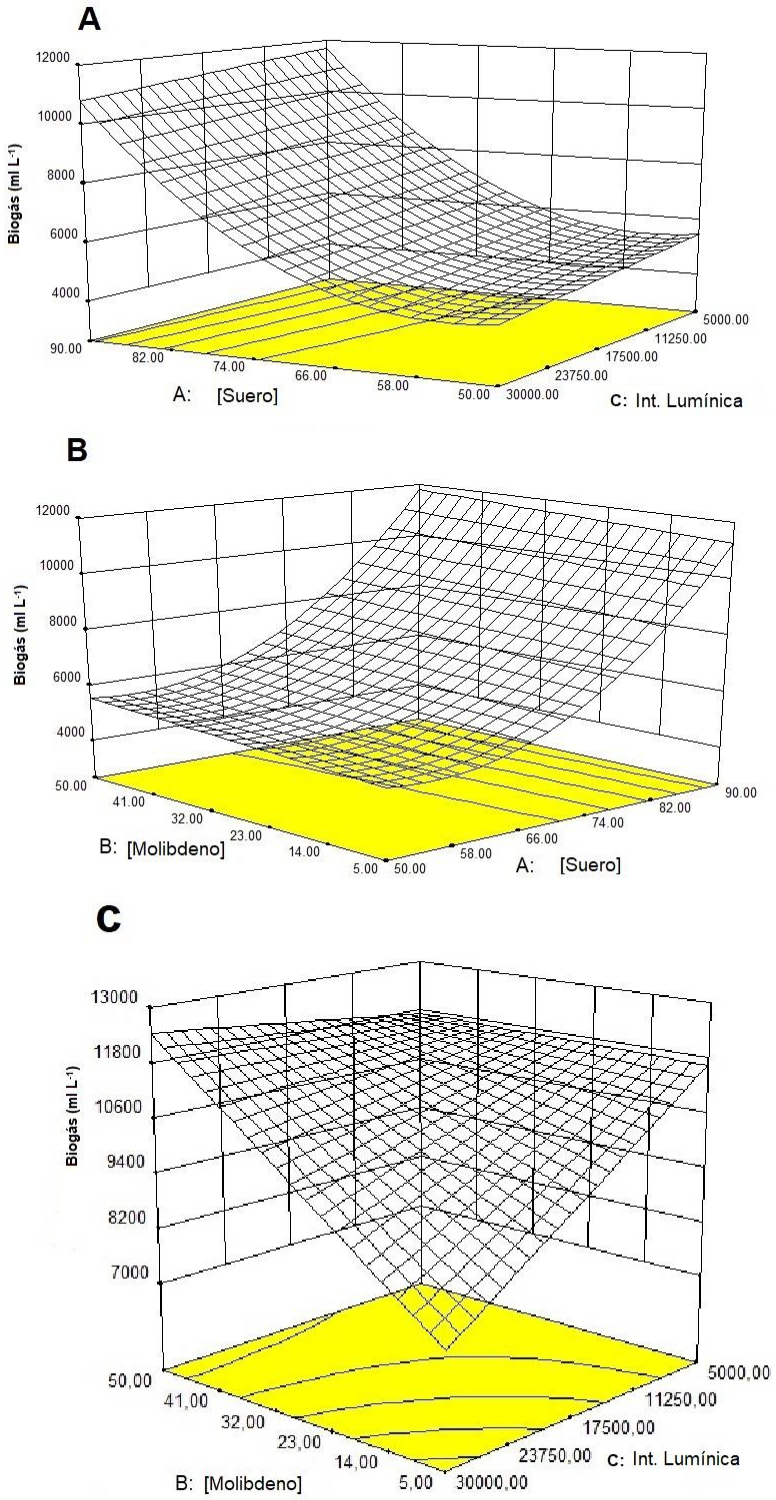
Adicionalmente se realizó la verificación estadística de los modelos mediante el análisis de distribución de las gráficas residuales (ver Anexo F) y se concluyó que los modelos eran adecuados.

4.3.1.1 Graficas 3D superficie de respuesta modelo Suero Industrial

La superficie de respuesta tridimensional para la producción de biogás está representada en la figura 4-2. Las gráficas se generan a partir del modelo cuadrático obtenido (Ecuación 3). Mediante estas gráficas es posible ver el comportamiento de las variables en el área de estudio y observar para que valor tiende a ser mayor la producción de hidrógeno.

Figura 4-2 Gráficos 3D Superficie de respuesta para modelo suero de leche Industrial Cepa IR3::LacZ Fosfato

A: [Suero] vs Intensidad lumínica, **B:** [Suero] vs [Molibdeno] **C:** Intensidad lumínica vs [Molibdeno]



En estas gráficas se observa que:

- La concentración de suero es la variable más influyente para la producción de hidrógeno. Hay una mejor producción de biogás a mayor concentración de suero.
- La producción de biogás permanece en su mínimo hasta una concentración de suero de 65% (v/v) a partir de esta concentración hay un incremento hasta llegar a las máximas producciones a concentración de 90% (v/v).
- La gráfica C representa la única interacción en la ecuación 3. Se observa que existe un mínimo de producción a alta intensidad lumínica y baja concentración de molibdeno.
- El efecto de las variables concentración de molibdeno e intensidad lumínica es pequeño. Estas variables tienden a influenciar positivamente la producción de hidrógeno.

4.3.1.2 Validación del modelo

Basándose en la Ecuación 3 del modelo se encontraron valores para maximizar la producción de biogás. Los valores obtenidos son representativos en el área de estudio, cualquier extrapolación debe ser confirmada a través de experimentos adicionales. Los experimentos realizados para la validación del modelo se representan en la Tabla 4-7.

Tabla 4-7 Puntos de validación para el modelo Suero industrial *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ

Corrida	[Suero]%	Intensidad Lumínica (Lx)	[Mo] µM	Biogás (ml L^{-1}) Modelo
P1	90	5000	50	11747
P2	88	21000	50	11436

En la tabla 4-8 se observan los resultados obtenidos en términos de la producción total de hidrógeno, los rendimientos producto/sustrato ($Y_{P/S}$) y la productividad volumétrica de hidrógeno. Este último se define como la producción real obtenida de hidrógeno sobre la producción máxima hipotética, teniendo en cuenta que la fuente de carbono presente en el suero es lactosa (12 moles H_2 mol^{-1} lactosa) y lactato (6 moles H_2 mol^{-1} lactato). La última columna es el error obtenido respecto al valor de producción de hidrógeno predicho por los modelos.

Los errores son menores al 5% por lo tanto con esta corroboración se concluye que los modelos representan adecuadamente el espacio de estudio de las variables y la producción de hidrógeno.

Tabla 4-8 Resultados experimentales en puntos de validación para suero industrial *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ

	DW (g ml^{-1})	**pH Final**	**Producción (ml L^{-1})**	**Productividad (ml $h^{-1}L^{-1}$)**	**$Y_{P/S}$** (mol H_2/mol sustrato)	**% Rendimiento $Y_{real}/Y_{teórico}$**	**Error modelo %**
P1	0.00535	4.26	11390.91	45.93	2.29	21%	3.0%
P2	0.00460	4.46	10872.73	40.42	2.17	20%	4.9%

Respecto a las condiciones en las cuales se maximiza la producción de biogás, se observa que la concentración de suero más elevada (90% v/v) dio los mejores resultados, lo cual es deseable pues se utiliza menos agua en el proceso y hay mayor producción de biogás con un menor volumen de trabajo. Los perfiles de producción (figura4-2) también indican que enriquecer el suero con molibdeno es favorable para la producción de biogás. Este resultado concuerda con estudios previos realizados por Eroglu 2011 [149] donde la adición de molibdeno al medio de cultivo incremento la producción de hidrógeno.
Al comparar el resultado obtenido con los estudios de la tabla 1-5 se observa que en la mayoría de los estudios el suero se utiliza diluido. Los resultados obtenidos representan entonces una ventaja de este trabajo pues se lograron mejores producciones con concentraciones más elevadas de suero. Además, la productividad volumétrica obtenida es superior comparada con los otros estudios de fotofermentación.

Como se pudo observar en la figura 4-2, la variable más influyente del proceso es la concentración del suero de leche, esto se debe a que el suero contiene la fuente de carbono (lactosa y lactato) y nitrógeno (proteínas), las cuales según los resultados obtenidos con el suero sintético son las variables más relevantes del proceso.

De acuerdo a los resultados se puede confirmar que el suero de leche puede ser utilizado para la producción biológica de hidrogeno mediante el proceso de fotofermentación con la bacteria recombinada *Rhodobacter capsulatus* cepa IR3::LacZ. El suero de leche tras ser sometido al proceso de fotofermentación presentó consumo de lactosa hasta de 98% (Anexo D).

4.4 Evaluación de etapa de homofermentación

Como se explicó con anterioridad la bacteria *Rhodobacter capsulatus* sin la recombinación no puede consumir lactosa. Sin embargo, en el proceso de fotofermentación puede utilizar ácidos orgánicos como sustrato. Estudios preliminares mostraron que *Rhodobacter capsulatus* cepa IR3::LacZ puede utilizar el lactato presente en el suero de leche para su crecimiento y producción de hidrógeno. Por tanto, se planteó el uso de una etapa de homofermentación previa a la fotofermentación con el fin de aumentar la concentración de lactato disponible en el medio para que la bacteria lo utilice como sustrato en la producción de hidrógeno y con ello aumentar su productividad.

4.4.1 Materiales y métodos

- ***Lactococcus lactis***

El microorganismo utilizado fue la bacteria *Lactococcus lactis*, subespecie *lactis, y cremoris*, descritas en la sección 2.1.2.

El medio de crecimiento de la bacteria es directamente el suero de leche reconstituido 1/10 y la preparación del inoculo se explica en la sección 2.2.3.

- **Suero de leche**

Se utilizó suero de leche en polvo anteriormente descrito en la sección 4.2.2. La reconstitución del suero se dio según especificaciones del proveedor 1 kg de suero por 9 L de H_2O. El suero reconstituido utilizado para esta etapa tiene una concentración de lactosa de 0.20 M, lactato 38 mM, proteína 10 g L^{-1} y un pH inicial de 6.4. El suero fue pretratado realizando solo el proceso de pasteurización VAT.

- **Experimentos Por lotes**

Los experimentos se realizaron en botellas herméticas cerradas de 500ml. Estos reactores contaban con un agitador magnético para mezclar el medio y se llenaron con un volumen total de 400 ml. No se adicionó ningún suplemento al suero. Los reactores se ubicaron en la cámara termorregulada a 30°C (sección 2.3.).

Para la selección de las condiciones de la homofermentación se realizaron pruebas preliminares en reactores de 20 mL, en las cuales se evaluó la temperatura y el pH inicial. El objetivo de estos experimentos no es maximizar la producción de ácido láctico pues una concentración demasiado elevada podría inhibir a *Rhodobacter capsulatus* y reducir la

producción de hidrógeno [119]. Se busca aumentar la disponibilidad de lactato en el medio, pero en una concentración no superior a 100 mM [150].

Se decidió utilizar las condiciones de pH 6.4 el cual es el pH inicial del suero, esto con el fin de no adicionar sales extra al medio. En el caso de la temperatura se seleccionó 30°C debido a que es la temperatura a la cual *Lactococcus lactis*, subespecie *lactis, cremoris* presenta las mejores productividades, además, esta es la temperatura a la que se realiza el proceso de fotofermentación lo cual presenta una ventaja si se pensara en hacer un co-cultivo con la bacteria fotofermentativa en un futuro.

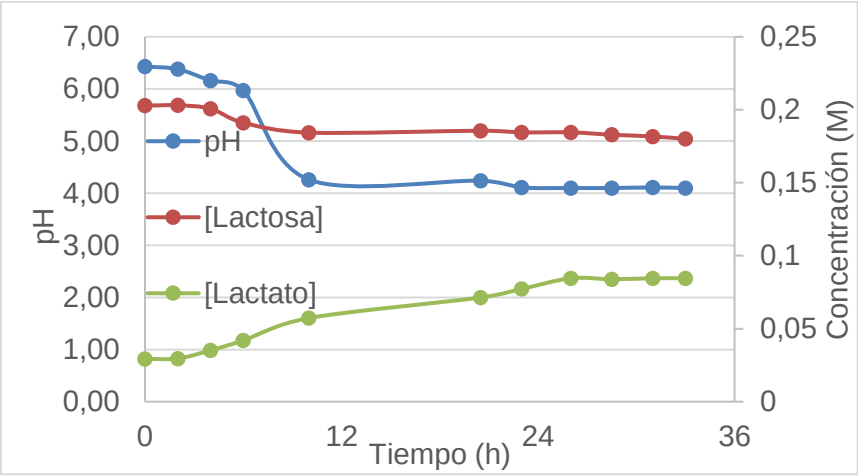
- **Procesamiento de muestras**

Se tomaron muestras a diferentes tiempos para determinar la evolución de los componentes del medio, por lo que se midió: pH y concentración de lactosa y lactato, estos últimos mediante HPLC (Ver anexo B).

4.4.2 Resultados

En la figura 4-3 se puede observar que hubo un descenso importante del pH en las primeras 12 horas. Lo que concuerda con la etapa de producción más importante de ácido láctico, periodo en el cual la concentración de lactato aumento de 38 a 57 mM. A partir de este momento tanto la producción de lactato como la disminución de pH se dieron de forma lenta hasta 36 horas, tiempo en el cual se estabilizó su valor.

Figura 4-3 Perfil de producción de lactato para las pruebas de homofermentación.



La concentración final de lactosa y lactato fue respectivamente 0.18 M y 85 mM, se consumió el 10% de la lactosa y se aumentó 2.2 veces la concentración de lactato. El bajo

consumo de lactosa se debe a que la bacteria se inhibe al bajar el pH del medio. El pH final del medio fue 4.1. Ya que no existe una variación importante de las condiciones del sistema después de las 24 horas, este se escogió como el tiempo de fermentación (figura 4-3).

4.4.3 Fotofermentación

Con el suero final obtenido tras el proceso de homofermentación se realizan los pretratamientos necesarios para utilizarlo ahora como medio para la producción de hidrógeno mediante fotofermentación. Se realiza el proceso de reducción de grasa, desproteinización y pasteurización empleado anteriormente (secciones 4.2.2.1 a 4.2.2.3). Después del pretratamiento realizado se obtuvo una concentración de lactosa, ácido láctico y proteína de 0.18 M, 85 mM y 3.5 g L^{-1} respectivamente.

Para evaluar la influencia del pretratamiento de homofermentación, en el proceso de fotofermentación y producción de hidrógeno, se hicieron experimentos en los puntos de validación seleccionados en la etapa anterior con la Ecuación 3 (Tabla 4-7), con el fin de comparar los resultados.

Tabla 4-9 Experimentos para comparación entre suero industrial con y sin pretratamiento de homofermentación. *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ

Corrida	% Suero (v/v)	Luz (Lx)	[Mo] µM
1	90	5000	50
2	88	21000	50

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4-10.

Tabla 4-10 Resultados pruebas con suero industrial con pretratamiento homofermentación *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ

	DW (g ml^{-1})	pH Final	Producción (ml L^{-1})	Productividad (ml $h^{-1}L^{-1}$)	$Y_{P/S}$ (mol H_2 mol^{-1}sustrato)	% Rendimiento $Y_{real}/Y_{teórico}$
1	0.00375	4.53	13036.36	69.71	2.96	28%
2	0.00535	5.02	14218.18	65.52	2.92	29%

Se obtuvo una producción de biogás y productividad mayores a las obtenidas con el suero sin homofermentación (tabla 4-8). Para el experimento 1 la producción fue 14 % superior y para el experimento 2 el incremento fue 31%.

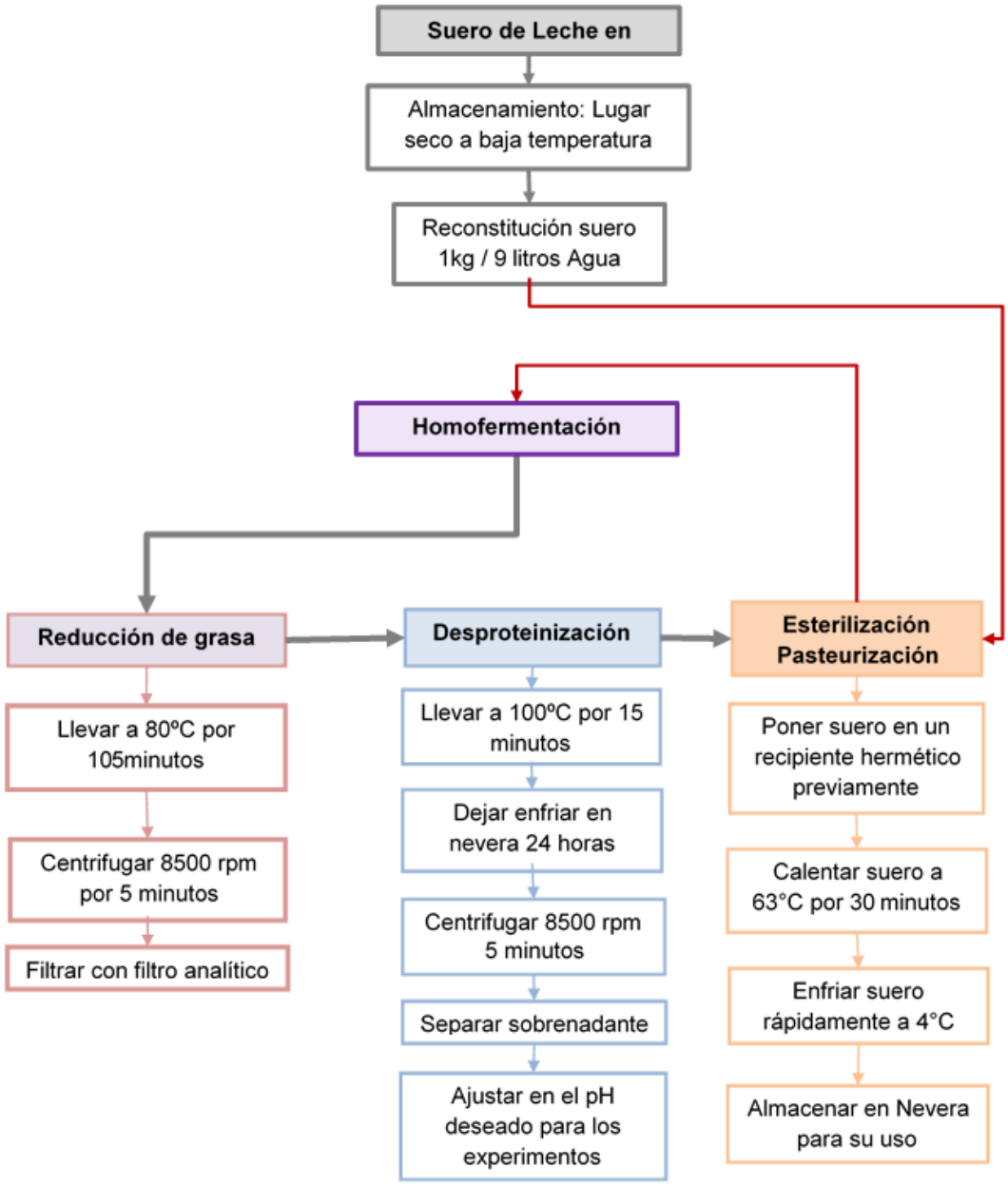
Para comprobar la hipótesis inicial, en la que se planteaba que la bacteria produciría más hidrógeno al tener una mayor disponibilidad de lactato, se analizó el medio final de los experimentos. A pesar de que la producción de biogás se incrementó, el consumo de lactato en el medio no aumentó (Anexo D). Al igual que en las etapas anteriores, para algunos experimentos inclusive existe un pequeño aumento en la concentración de lactato [141] por lo que no se sabe con certeza si la bacteria utilizó el lactato extra proporcionado mediante el proceso de homofermentación.

Al considerar los resultados obtenidos en la etapa experimental con suero sintético, la producción de hidrógeno se ve favorecida a mayores concentraciones de ácido láctico. Esto indica que la bacteria debe consumir parte de este sustrato en etapas tempranas del proceso o que la disponibilidad en el medio le facilita el crecimiento inicial. Esta misma consideración se puede hacer con el sustrato suero de leche industrial. Es posible que haya un consumo inicial de lactato en el medio, el cual no podemos percibir debido a la posterior producción del mismo. Otro factor que es necesario analizar es el efecto de *lactococcus lactis* en el medio. Esta bacteria utiliza el suero de leche como sustrato para crecer, producir ácido láctico y posiblemente otros metabolitos como vitaminas, bacteriocina o exopolisacaridos [151,152]. Gracias a la acción de esta bacteria el medio está cambiando la composición y este cambio afecta positivamente la fotofermentación lo que se refleja en el aumento de la producción de hidrógeno.

La implementación de una etapa de homofermentación trae otras ventajas en el pretratamiento, pues al disminuir el pH mediante la acumulación de ácido láctico en el medio, simplifica los procesos de desproteinización y reducción de grasa, disminuyendo la concentración de sales en el medio final pues no se requiere adicionar ácido.

Teniendo en cuenta los resultados se decidió utilizar la homofermentación como un pretratamiento del suero de leche pues se evidenciaron mejoras en la producción de hidrógeno y la productividad. El pretratamiento del suero con la adición de esta etapa se muestra en la figura 4-4.

Figura 4-4 Metodología de pretratamiento suero con adición de la etapa de homofermentación



4.5 Conclusiones y recomendaciones

4.5.1 Conclusiones

- El estudio de las modificaciones de las variables, concentración de suero y molibdeno, intensidad lumínica y solución amortiguadora condujo a mejoras en la producción de hidrógeno utilizando como sustrato suero de leche industrial y la bacteria *Rhodobacter capsulatus* cepa IR3::LacZ.
- El uso de la metodología de diseño de experimentos (DOE) proporcionó un diseño que representan adecuadamente el efecto de las variables, para el estudio de la producción de hidrógeno en reactores por lotes con la solución amortiguadora fosfato. Mediante este diseño se pudieron encontrar las mejores condiciones que favorecen la producción de hidrógeno para el intervalo estudiado.
- La concentración de suero de leche es la variable más influyente para la producción de hidrógeno.
- Es necesario realizar un pretratamiento y suplemento del suero de leche para utilizarlo como sustrato en la producción de hidrógeno. Una etapa de homofermentación previa a la fotofermentación mejora la productividad y producción de hidrógeno.
- Se determinó que el uso la solución amortiguadora Kolthoff resulta negativa para el proceso de producción de hidrógeno con suero de leche industrial.
- Se selecciona la solución amortiguadora fosfato para realizar experimentos de escalado.

5. Estudio de la cinética de producción de hidrógeno

En esta etapa se realizó el escalado de los experimentos a un volumen de 1.5 L para el suero sintético y 1 L para el suero industrial. Las condiciones experimentales se seleccionaron teniendo en cuenta los modelos obtenidos para *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ en las etapas anteriores, buscando las máximas de producciones alcanzadas. Adicionalmente se estudió la influencia del control del pH sobre el proceso de producción de hidrógeno. Se realizaron tres experimentos con suero sintético: dos sin control de pH (fosfato y Kolthoff) y uno con control de pH (fosfato). Adicionalmente se realizó un experimento con suero de leche industrial con control de pH. Como resultado de esta etapa se obtuvieron los perfiles de producción y consumo de los componentes del medio para cada experimento.

Al analizar estos perfiles se observó una producción alta de ácidos orgánicos (AO) lo cual no es esperado para este microorganismo, se realizó un análisis en el medio y se encontró que existía contaminación en los reactores con *Clostridium intentinale*. Esta contaminación llevó a una alta producción de biogás compuesto exclusivamente por H_2 y CO_2 este último en una concentración no superior a 30% (v/v). Se concluyó que el proceso de producción integrada es una opción con gran potencial para el uso del suero de leche como sustrato en la producción de hidrógeno. Se determinó además que el control de pH favorece la producción de hidrógeno incrementándola 15% respecto al experimento sin control de pH. Las productividades volumétricas obtenidas para los experimentos con suero sintético y solución fosfato fueron 13.14 ml $h^{-1}L^{-1}$ para el experimento sin control de pH y 15.53 ml $h^{-1}L^{-1}$ para el experimento con control de pH. El experimento con suero industrial y control de pH tuvo una productividad volumétrica de 32.8 ml $h^{-1}L^{-1}$.

This stage shows the scale-up of the experiments to a volume of 1.5 L for synthetic whey and 1 L for industrial whey. The experimental conditions were chosen from the models obtained for *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ in the previous stages. The influence of pH control on hydrogen production process was also studied in this stage. Three experiments were made with

synthetic whey: two without pH control (buffer phosphate and Kolthoff) and one with pH control (buffer phosphate). Additionally, an experiment was conducted with industrial whey with pH control. The results of this stage were the profiles of production and medium composition for each experiment. Analyzing these profiles, a high production of organic acids (AO) was observed, which is not expected for this microorganism. So, a media analysis was made finding contamination in the reactors *Clostridium intestinale*. This contamination led to a high production of biogas composed exclusively of H_2 and CO_2, the latter at a concentration not higher than 30% (v/v). Because of that, it was concluded that the integrated production process between photofermentation and dark fermentation has great potential for the use of whey as substrate in the production of hydrogen.

It was further determined that the pH control increases the production of hydrogen by 15%. The volumetric productivities obtained with synthetic whey experiments were 13.14 ml $h^{-1}L^{-1}$ for the experiment without pH control and 15.53 ml $h^{-1}L^{-}1$ for the experiment with pH control. The experiment with industrial whey and pH control had a volumetric productivity of 32.8 ml $h^{-1}L^{-1}$.

5.1 Introducción

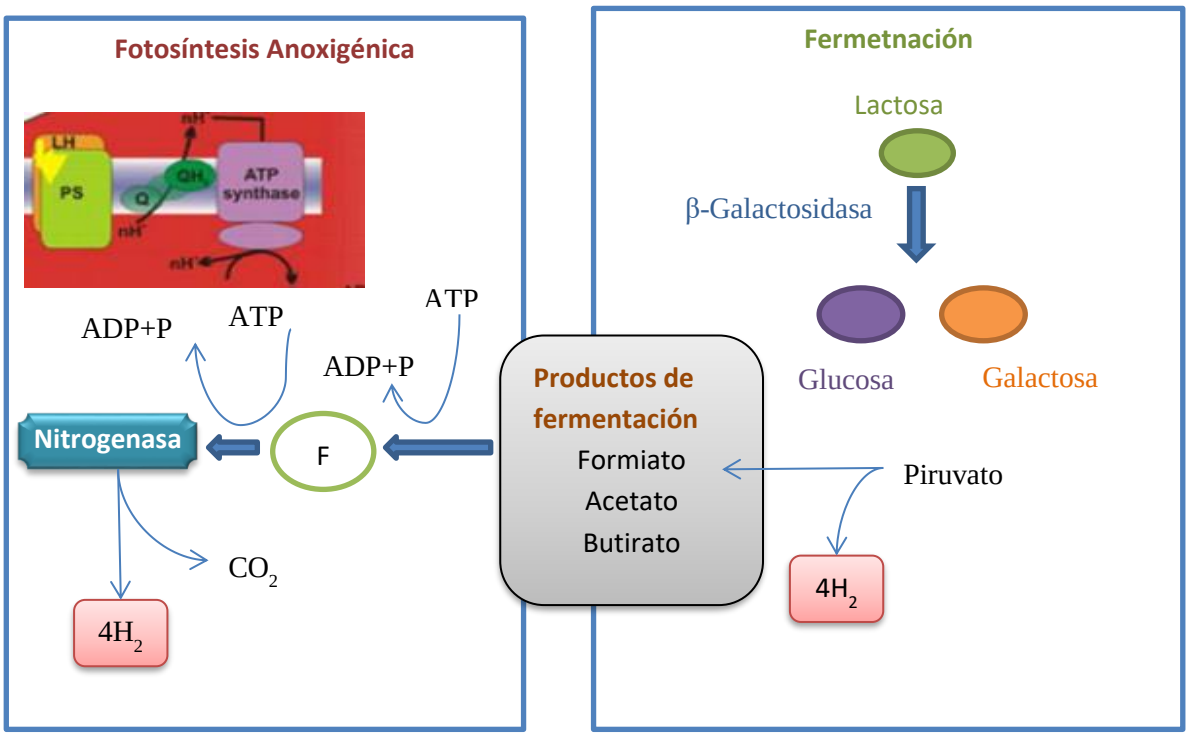
Existen dos proceso fermentativos con los cuales se puede obtener hidrógeno partiendo de suero de leche, lo cuales se explicaran a continuación.

5.1.1 Fotofermentación

El punto de partida de todos los procesos de producción de hidrógeno que se llevan a cabo con la presencia de luz es la fotosíntesis. Existen dos tipos de fotosíntesis, la oxigénica (que produce O_2) que es realizada por plantas y cianobacterias, y la anoxigénica que se lleva a cabo por ejemplo por bacterias purpuras y bacterias verdes del azufre (GS). La bacteria *Rhodobacter capsulatus* lleva a cabo una fotosíntesis anoxigénica [30].

En términos de la producción de hidrógeno las bacterias purpuras no del azufre (PNS) y las bacterias *Geobacter sulfurreducens* (GS) tienen una ventaja en la fermentación, ya que estas tienen una alta eficiencia en la conversión del sustrato a hidrógeno y además pueden utilizar una gran variedad de sustratos para crecer (figura 5-1) [153,154]. Bacterias como el *Rhodospirillum sp. y Rhodobacter sp.* pueden usar un amplio rango de ácidos orgánicos y carbohidratos como sustratos para la producción de hidrógeno con tasas de crecimiento superiores a 140- 200 ml de $H_2\, g^{-1}$peso seco h^{-1} [30,139,155].

Figura 5-1 Bioquímica del proceso de producción de hidrógeno mediante fotosíntesis *Adaptado de [30]



En la fotofermentación el sustrato es oxidado en el ciclo de ácido tricarboxílico con el paso de e^- por un sistema de transporte vía NAD^+/NADH y ferrodoxina antes de ser recombinado con H^+ mediante la nitrogenasa para producir H_2. Este proceso requiere hidrólisis de ATP la cual es producida por un gradiente fotosintético de H^+. El gen de la nitrogenasa (N_2ase)-codificado es el encargado para la producción de hidrógeno en las bacterias PNS y GS. Este se expresa en presencia de luz, en condiciones anaerobias y ausencia de amonio, se encarga de catalizar la conversión de: $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$. Dos moléculas de ATP se deben hidrolizar por cada electrón que se deja libre para la producción de hidrógeno, haciendo la reacción altamente dependiente de ATP [18,26,30].

5.1.2 Fermentación oscura

Uno de los métodos más utilizados para la generación de hidrógeno es extraerlo de los productos basados en carbohidratos usando bacterias fermentativas (figura 5-1) [26]. La producción de hidrógeno por este método es realizada por bacterias estrictas y facultativas anaerobias, quimioheterótrofas que crecen en oscuridad y tienen hidrogenasa capaz de

producir hidrógeno. Estas bacterias usan sustratos ricos en carbohidratos y pueden conseguir una conversión casi completa de los azucares utilizando las enzimas del ciclo oxidativo pentosa fosfato [30]. Entre los organismos que realizan este proceso se encuentran los del género *Clostridium* como son *C. buytricum, C. thermolactium, C. pasteurianum, Thermotoga maritima, Thermococcus kodakarensis* KOD1 y *Enterobacter cloacae* [2,25].

Debido a limitaciones termodinámicas se obtiene un máximo de producción de hidrógeno de 4 moles mol^{-1} de glucosa cuando el principal subproducto formado es ácido acético. Esta tasa es menor (inferior a 2 mol H_2 mol^{-1} glucosa) cuando se producen otros metabolitos reducidos como ácido butírico [156,157]. Para la galactosa se presentan rendimientos de 2.60 moles H_2 mol^{-1} galactosa[158,159]. La producción de hidrógeno mediante fermentación oscura utilizando suero de leche como sustrato ha sido estudiada con anterioridad [98,157,160–163]. Entre los mejores rendimientos obtenidos en estos trabajos se encuentran 6.35 mol H_2/mol lactosa con una producción acumulada de 3330 ml L^{-1} y unas tasas de producción entre 139 ml $L^{-1}h^{-1}$ [163] y 3.46 ml $H_2L^{-1}h^{-1}$ [113].

5.1.3 Proceso integrado

Actualmente se están realizando esfuerzos en el desarrollo de un sistema de producción integrado en el cual se combinen los procesos de producción de hidrógeno a la luz y a la oscuridad. De esta forma el medio resultante tras la producción de hidrógeno mediante fermentación oscura es utilizado, como medio para la producción de hidrógeno mediante fotofermentación [164].

Durante la fermentación oscura para la producción de hidrógeno los microrganismos convierten azucares presentes en el medio con un rendimiento no mayor a 33%, generando como subproductos ácidos orgánicos [71]. La principal diferencia entre la fermentación a la luz y a la oscuridad es que en la primera se utiliza la luz como fuente de energía lo que permite a los microorganismos emplear sustratos como ácidos orgánicos. Por esta razón los subproductos generados durante la fermentación oscura pueden ser oxidados en la etapa de fotofermentación hasta CO_2 e H_2[165,166]. El proceso de fotofermentación, sobresale por su alta tasa de conversión de sustrato comparado con la fermentación oscura o la biofotólisis [133,167,168].

5.2 Métodos y Materiales

5.2.1 Microorganismo y medio

- ***Rhodobacter capsulatus***

El microorganismo utilizado fue la cepa recombinada de la bacteria *Rhodobacter capsulatus*, IR3::LacZ.

El medio de crecimiento de la bacteria es el medio RCV descrito con anterioridad al igual que el procedimiento para preparar el inoculo. (ver secciones 2.2.1 y 2.2.2).

Para el caso del reactor de suero de leche industrial se realizó el crecimiento del inóculo de la bacteria en un medio RCV modificado con una adición de lactosa 0.1 M con el fin de disminuir los tiempos de adaptación de la bacteria al medio.

- ***Lactococcus Lactis***

Se utilizó la bacteria *Lactococcus lactis*, subespecie *lactis, cremoris*, descritas en la sección 2.1.2, para la etapa de homofermentación en el pretratamiento del suero industrial.

El medio de crecimiento de la bacteria es directamente el suero de leche reconstituido 1/10 y la preparación del inóculo se explica en la sección 2.2.3.

5.2.2 Suero de Leche

Se utilizó suero en polvo del mismo lote durante todo el proyecto, el mismo descrito en la sección 4.2.2, comprado la empresa CIMPA s.a.s. El suero fue caracterizado, determinando su composición la cual se muestra en la tabla 4-1. La reconstitución del suero se dio según especificaciones del proveedor 1 kg de suero / 9 L de H_2O desionizada. El suero reconstituido tiene una concentración de lactosa de 0.2M, lactato 35 mM, proteína 9 g L^{-1} y un pH inicial entre 6.2 - 6.4.

5.2.3 Experimentos por lotes

Los experimentos se realizaron en reactores cilíndricos de vidrio de 2 L y 1.5 L herméticamente cerrados. Los reactores contaban con un agitador magnético para mezclar el medio y se llenaron con un volumen total de medio de 1.5 L en el caso de los experimentos con suero sintético y 1 L para suero industrial.

Los reactores se ubicaron en una cámara termorregulada a 30°C que cuenta con una bombilla como fuente lumínica. Se puso un sensor de CO_2 (apartado 2.4.4) a la salida del reactor para

determinar su concentración en el biogás, después se colocó una trampa de hidróxido de sodio para retirar parte del CO_2 de la corriente de biogás. Finalmente, el biogás rico en hidrógeno (>98%) fue captado y medido mediante un sistema basado en el desplazamiento de volumen. Tanto el sistema de captación de biogás, como la cámara utilizada se describen con más detalle en la sección 2.1.3.

Figura 5-2 Reactor de 2 L utilizado en los experimentos de escalado

En la tabla 5-1 se presentan las condiciones de los experimentos realizados:

Tabla 5-1 Condiciones de los experimentos reactor escalado.

Suero Sintético							
Modelo Cepa IR3::LacZ	**pH**	**Lactosa (M)**	**Lactato (mM)**	**Glutamato (mM)**	**Int. Lumínica (Lx)**	**Biogás (ml L^{-1}) Predicción**	**Control de pH**
Fosfato	7.2	0.145	26	50	6000	9369	No
Kolthoff	6.8	0.15	17	50	10000	11700	No
Fosfato	7.2	0.145	26	50	6000	9369	Si

Suero Industrial					
Modelo	**%Suero**	**Int. Lumínica (Lx)**	**[Mo] µM**	**Biogás (ml L^{-1}) Predicción**	**Control de pH**
IR3::LacZ	90	5000	50	11747	Si (7.3)

5.2.4 Procesamiento de muestras

Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se realizó un análisis del medio final del reactor para determinar:

- pH
- Densidad Óptica
- Peso seco
- Composición del medio

La metodología de procesamiento de muestras se encuentra descrita de forma más específica en la sección 2.5.

5.3 Resultados y Análisis

5.3.1 Producción de biogás

La producción de biogás reportada es el volumen total de biogás obtenido después del paso por una trampa de NaOH con la cual se capturó parte importante del CO_2, esta corriente contiene hidrógeno a una concentración superior al 98% (apartado 2.4.4). La medición de la producción se expresa en mililitros de biogás por volumen de trabajo.

Primero, se realizaron los experimentos con suero sintético, dos sin control de pH para las soluciones amortiguadoras Kolthoff y fosfato y uno con control de pH para con la solución fosfato, los resultados generales se observan en la tabla 5-2.

Tabla 5-2 Resultados generales Suero sintético. *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ

Variable	Solución Kolthoff Sin control de pH	Solución Fosfato Sin control de pH	Solución Fosfato Con control de pH
Biogas ml L^{-1}	2953	7055	8247
%Consumo de Lactosa	30	88	95
Tiempo inicio de producción (h)	48	50	48
Tiempo de producción total (d)	8	18	17
Productividad (ml $h^{-1}L^{-1}$)	9.34	13.14	15.53
$Y_{P/S}$ (mol H_2 mol^{-1} C)	0.62	1.42	1.46

Al comparar los resultados de los experimentos sin control de pH, se observa que la solución Kolthoff presentó una producción baja, inferior a la esperada según los resultados de la primera etapa. Este experimento, del cual se realizó una réplica obteniendo resultados similares, tuvo un comportamiento inesperado. Al observar los resultados obtenidos en los experimentos de la primera etapa, se advierte que los tiempos de adaptación de *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ fueron superiores para la solución amortiguadora Kolthoff, esto indica que la presencia de esta solución amortiguadora dificulta el crecimiento de la bacteria. Además, los experimentos realizados con suero industrial con solución Kolthoff también tuvieron una producción baja (tabla 4-3). Una hipótesis para esta variación en el comportamiento de la bacteria es que el bórax adicionado al medio pone en estrés a la bacteria y por esta razón se vuelve más sensible a variaciones en las condiciones, como son la distribución de la luz en el reactor de 1.5 L o la composición del medio en el caso del suero industrial. Para determinar si la forma del reactor y la distribución de la fuente lumínica sobre el mismo influye, se realizaron ocho experimentos en reactores de 125 ml con suero sintético (dos para solución fosfato, dos para solución Kolthoff y sus repeticiones). Se utilizaron dos tipos de reactor diferentes: reactor de cara plana (sección 2.3) y reactor cilíndrico (diámetro 7 cm). Como resultados se obtuvo que los experimentos realizados en el reactor de cara plana produjeron más biogás e iniciaron la producción del mismo antes que los experimentos en reactores cilíndricos. En el caso de la solución fosfato, la diferencia en la producción y en el tiempo de adaptación de la bacteria fue de 8% y 10 horas respectivamente. Para la solución Kolthoff, la producción fue 25% superior y se inició la producción de hidrógeno 15 horas antes. Esto indica que aún con la agitación constante en el medio, la forma del reactor y la distribución de la fuente lumínica sobre el mismo afecta el rendimiento, además este efecto es más marcado para la solución amortiguadora de Kolthoff.

En los experimentos con la solución amortiguadora fosfato podemos comparar el efecto del control de pH sobre la producción de hidrógeno. Se obtuvo una mejora de 15% en la producción de biogás y el consumo de lactosa incremento de 88 a 95%. Sin embargo, los tiempos de inicio de producción de hidrógeno son de alrededor de 50 horas, este incremento, comparado con la primera etapa del proyecto (30 horas) se debe posiblemente al cambio en la geometría de los reactores que también afectó los experimentos con solución fosfato.

Teniendo en cuenta lo anterior, para el experimento con suero de leche industrial, se decidió trabajar con control de pH y preparar un inoculo que tuviera lactosa, con el fin de acelerar la adaptación de la bacteria en el medio y el inicio de la producción de hidrógeno.

Tabla 5-3 Resultados generales Suero industrial. *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ

Variable	Con control de pH
Biogas ml L^{-1}	8629
%Consumo de Lactosa	100
Tiempo inicio de producción (h)	9
Tiempo de producción total (d)	10
Productividad (ml $h^{-1}L^{-1}$)	32.81
$Y_{P/S}$ (mol H_2 mol^{-1} C)	1.61

Al comparar las tablas 5-2 y 5-3 se puede observar que la productividad de los reactores de suero sintético fue más baja que la del suero industrial. Esto ocurre porque los tiempos de adaptación de la bacteria al medio son mayores para el suero sintético, 50 horas, mientras que para el experimento con suero industrial el tiempo de ajuste de la bacteria fue de 9 horas. Lo cual significa que la preparación del inoculo con lactosa efectivamente acelero la adaptación de la bacteria al medio.

Sin embargo, al analizar la composición final del medio se observó algo inesperado ya que había una acumulación alta de ácidos orgánicos, lo cual no es un comportamiento esperado para *Rhodobacter capsulatus*. Debido a esto se sospechó la existencia de una contaminación en el medio, que se confirmó primero visualmente. Posteriormente mediante el secuenciamiento de las muestras se identificó el contaminante presente en todos los reactores como *Clostridium intestinale,* esta es una bacteria patógena aislada de las heces del ganado[169]*.* Está bacteria produce hidrógeno mediante el método de fermentación oscura, aunque no se encontró ningún estudio realizado con esta bacteria para este propósito, posiblemente por su patogenicidad.

A continuación, se observan los perfiles cinéticos presentados para cada experimento realizado.

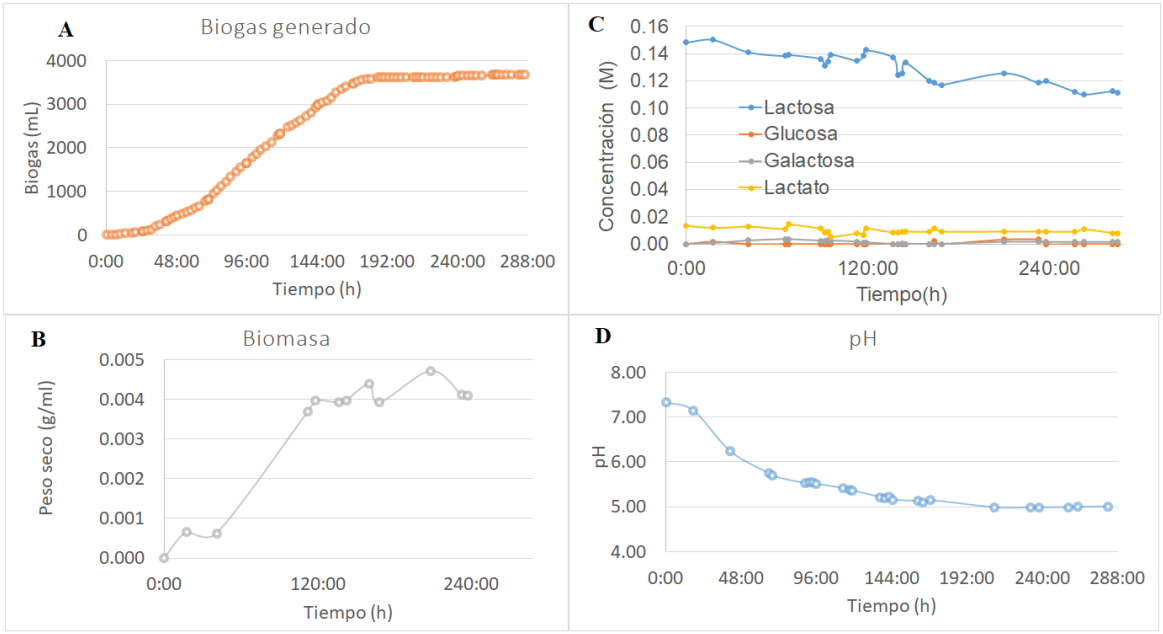
5.3.2 Perfiles cinéticos

En la figura 5-3 se presentan los perfiles del comportamiento del reactor de suero sintético con la solución Kolthoff. En estas gráficas se puede observar que:

Figura 5-3 Perfil cinético Reactor suero sintético 1.5 L sin control de pH *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ con solución de Kolthoff

A: Cinética de producción de biogás. **B:** Variación de biomasa en el tiempo.

C: Evolución de la composición del medio. **D:** Evolución del pH.



- La producción de biogás inició alrededor de 48 horas y su velocidad se mantuvo constante hasta alcanzar los 3500 ml en un tiempo de 192 horas, a partir de este momento no hubo una producción significativa (figura 5-3 A).
- La bacteria creció de forma acelerada entre 48 y 120 horas alcanzando un peso seco de 0.0040 g ml^{-1} de medio, a partir de 120 horas el peso seco no presentó cambios significativos (figura 5-3 B).
- En el tiempo total de producción, la bacteria solo consumió 0.06 M de lactosa. Esto indica que algo en las condiciones del medio la bacteria crece con dificultad y esto afecta también la producción de hidrógeno.
- El pH final obtenido fue de 5,0 valor esperado pues en todos los experimentos realizados en los cuales la bacteria utilizaba la lactosa como sustrato ocurre una disminución del mismo, en esa misma proporción.

Debido a los resultados obtenidos, se decidió no utilizar la solución Kolthoff para los experimentos con control de pH.

La figura 5-4 presenta los resultados obtenidos para el reactor sin control de pH con medio sintético y solución amortiguadora fosfato. En esta figura se observa que:

- El pH disminuyó de forma acelerada alcanzando su valor final de 5.6 en un tiempo de 90 horas (figura 5-4C).
- La producción de biogás se llevó a cabo en tres etapas (figura 5-4 A):
    - La primera etapa entre 50 y 162 horas, en la cual se obtuvo una velocidad de producción de biogás de 27 ml h^{-1},
    - La segunda etapa de 162 hasta 286 horas, la velocidad de producción fue de 44 ml h^{-1}.
    - La producción finalizó a 450h, la etapa final tuvo una velocidad de 2 ml h^{-1}.
- El peso seco vario de forma semejante a la producción de biogás (figuras 5-4 B):
    - Inicialmente se dio un crecimiento acelerado del microorganismo hasta 50 horas alcanzando una concentración de peso seco en el medio de 0.0017 g ml^{-1} de medio.
    - Entre 50 y 162 horas la velocidad de crecimiento se redujo hasta que se llegó a una concentración de 0.0025 g ml^{-1} de medio.
    - Entre 162 y 213 horas se dio un aumento acelerado en el peso seco reportado en el medio hasta alcanzar una concentración de 0.0040 g ml^{-1} de medio, este valor permaneció estable hasta el final del experimento.
- Respecto al consumo de lactosa (figura 5-4 D) se observa que:
    - El consumo de lactosa inicio a las 42 horas.
    - Entre 42 y 116 horas el consumo de lactosa tuvo una velocidad de 1.1 mmoles h^{-1}.
    - Entre 162 y 258 horas la velocidad de consumo de lactosa aumento hasta 1.55 mmoles h^{-1}.

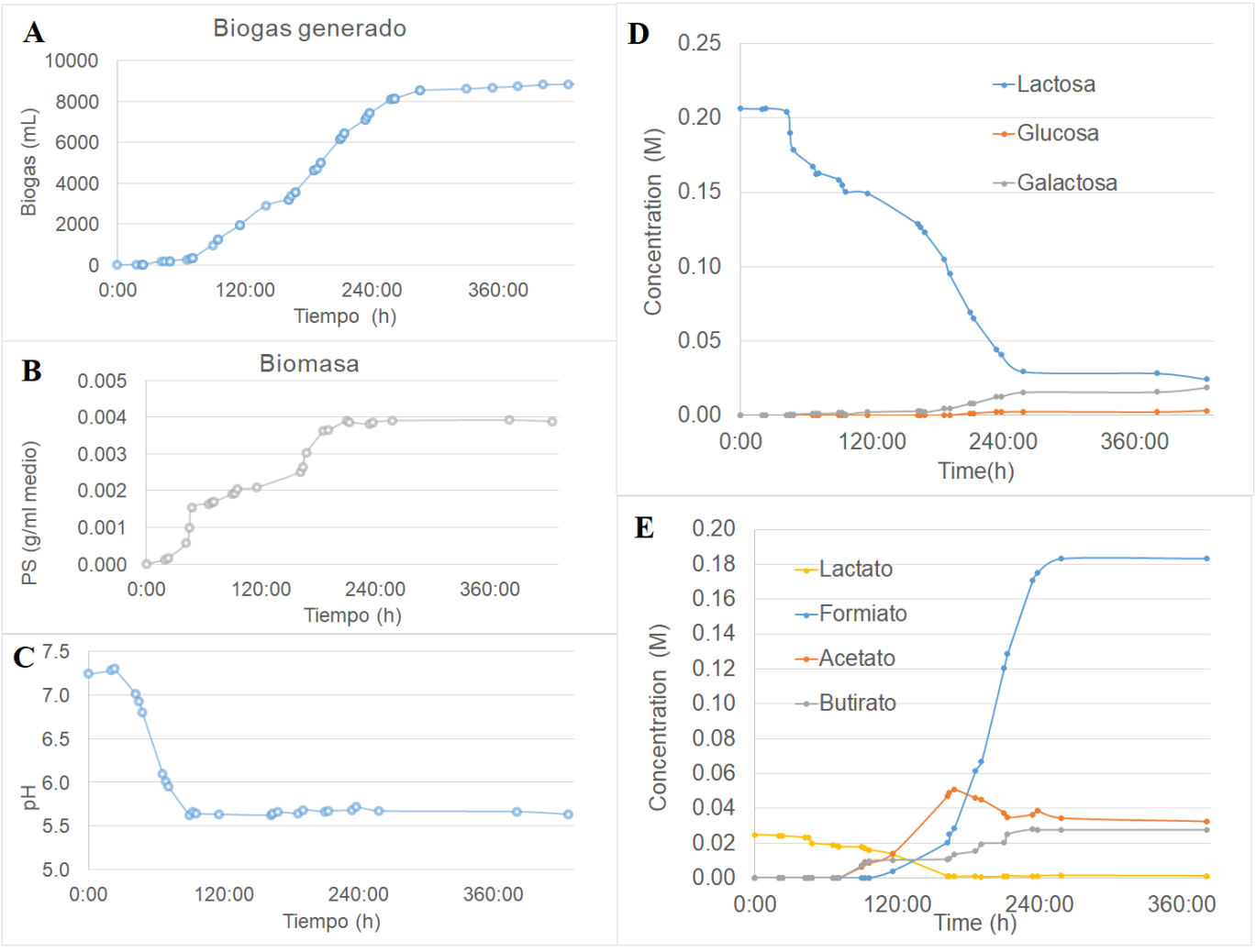
Los perfiles del reactor indican que hay una relación entre la producción del biogás, el consumo de lactosa y el crecimiento de los microorganismos en el medio. En las primeras 50 horas no hay producción de biogás y la bacteria crece en el medio consumiendo parte del lactato. Alrededor de la hora 50, comienza el consumo de lactosa y el microorganismo sigue creciendo a medida que se produce biogás. Los tres procesos se llevan a cabo de manera simultánea consumo de lactosa, producción de biogás y crecimiento de la bacteria Cualquier variación en el comportamiento de la bacteria se ve reflejada en los tres perfiles.

- Las gráficas 5-4 D y E muestran como fue la cinética de producción y consumos en el medio:

- Se consumió el 88% de la lactosa.
- La concentración final de galactosa obtenida 19 mM.
- Existe una producción importante de los ácidos orgánicos: fórmico 195 mM, butírico 28 mM y acético 38 mM, hay un consumo total del ácido láctico.

Figura 5-4 Gráficos reactor 1.5 L suero sintético sin control de pH. *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ con Solución Fosfato

A: Cinética de producción de biogás.
B: Variación del peso seco del medio en el tiempo.
C: Evolución del pH.
D: Consumo y producción de azúcares en el medio
E: Consumo y producción de ácidos orgánicos en el medio.



El comportamiento esperado para *Rhodobacter capsulatus* cepa IR3::LacZ es un bajo consumo de galactosa [119] y por tanto debería haber una acumulación de la misma en el medio.

Además, la formación de ácidos orgánicos (AO) en altas concentraciones tampoco es común [30].

Según los perfiles obtenidos *Clostridium intestinale,* el microrganismo contaminante está consumiendo la galactosa, y posiblemente glucosa produciendo CO_2 , H_2 y ácidos orgánicos.

Es posible asegurar que existe una influencia de la bacteria fotosintética en la producción de hidrógeno debido al consumo presentado de los ácidos orgánicos (*clostridium* no consume ácidos orgánicos) [87,99]. Como se mencionó anteriormente hubo un consumo total del ácido láctico además el medio presenta una coloración que indica la presencia de bacterias purpuras no sulfuradas (figura5-2).

Según lo que se observa en la figura 5-4 se puede pensar que existe una relación entre el pH y la formación de ácidos orgánicos pues está comienza cuando el pH disminuye.

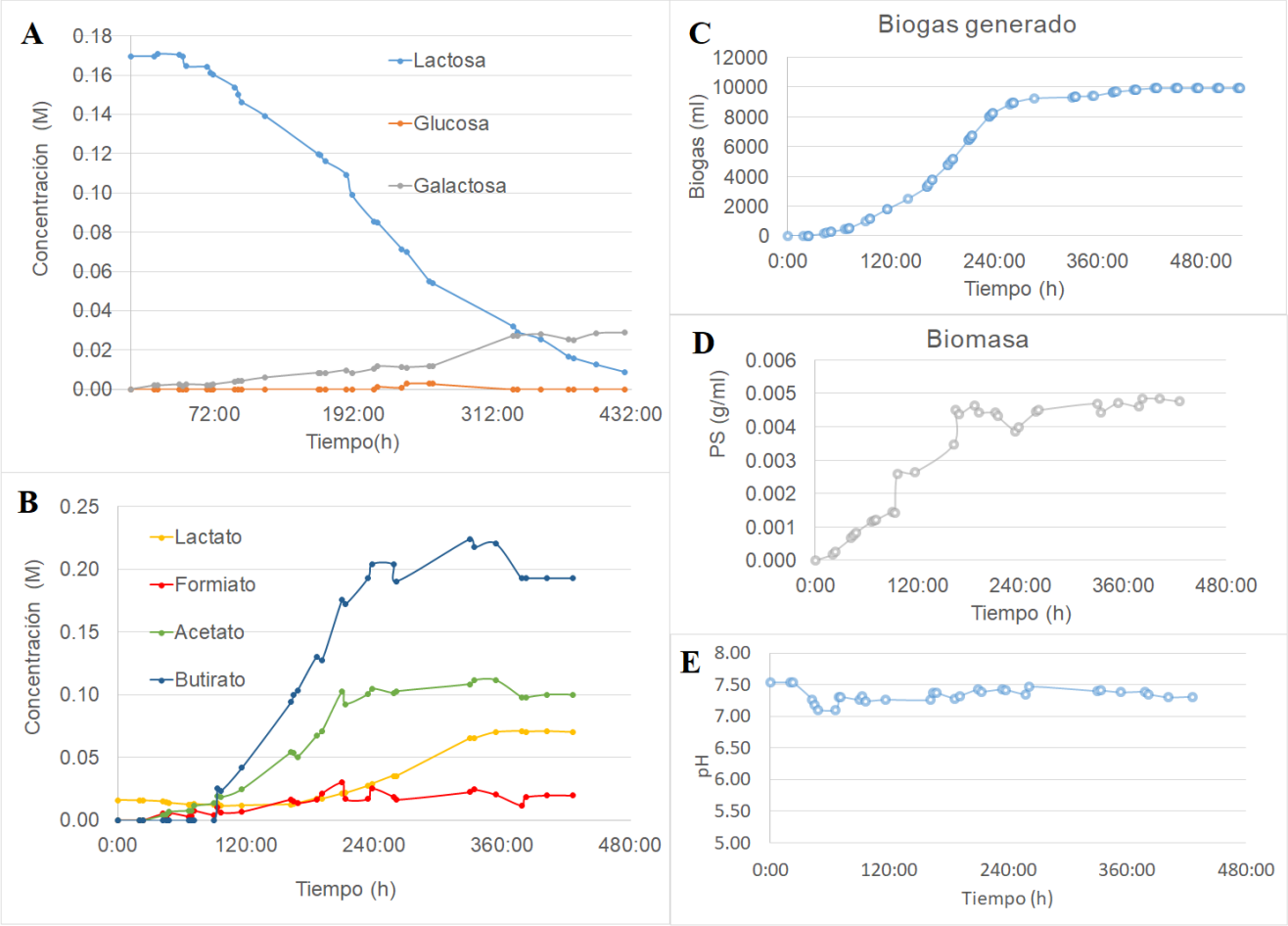
Con el fin de determinar las condiciones del biogás y la influencia de la contaminación sobre este, se realizó la determinación cualitativa de su composición mediante cromatografía de gases (sección 2.4.4). Tras un análisis del biogás de salida del reactor se determinó que está compuesto únicamente por hidrógeno y dióxido de carbono.

En la figura 5-5 se muestran los resultados del experimento de suero sintético con control de pH. En esta figura se puede observar que:

- Al igual que en los perfiles para el experimento sin control de pH, para la producción de hidrógeno hay 3 intervalos de tiempo con diferente comportamiento (figura 5-5C):
    - En el primero intervalo entre 48 a 162 horas se produjeron 3277 ml con una velocidad de producción de 29 ml h^{-1}.
    - El segundo intervalo va hasta un tiempo de 262 horas, la velocidad de producción fue de 57 ml h^{-1} hasta alcanzar un volumen de producción total de 8955 ml.
    - La producción de biogás finalizó en 426 horas, la fase final de producción tuvo una velocidad de 5.6 ml h^{-1}.
- Respecto al consumo de lactosa se observa una tendencia similar a la presentada en la gráfica de producción de biogás:
    - Inicialmente, se consumió 35% de la lactosa en las primeras 186 horas.
    - En la segunda etapa, hasta 262 horas la velocidad de consumo fue mayor, en ese intervalo de tiempo se consumió 33% de la lactosa para un total de 68%.
    - El 27% de lactosa restante se consumió entre 261 y 426 horas.

- Respecto al consumo (lactosa) y producción de azucares (glucosa y galactosa) (figura 5-5A) se observa que:
    - Al finalizar el experimento se consumió 95% de la lactosa presente en el medio inicial, un total de 241 mmoles.
    - La concentración final de galactosa obtenida 19 mM.

Figura 5-5 Gráficos reactor suero sintético 1.5 L con control de pH. *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ con Solución Fosfato
A: Consumo y producción de azúcares en el medio
B: Consumo y producción de ácidos orgánicos en el medio
C: Cinética de producción de biogás.
D: Variación del peso seco del medio en el tiempo.
E: pH



    - Hubo producción de ácidos orgánicos:
        - Ácido butírico, tuvo una concentración máxima de 220 mM y al final del experimento tenía una concentración de 193 mM.

- Ácido láctico, concentración final de 70 mM.
- Ácidos acético y fórmico con una concentración final de 100 mM y 19 mM respectivamente.

Al igual que en el reactor con suero sintético sin control de pH, hubo una contaminación con *Clostridium intestinale*. Se realizó un análisis cualitativo del gas, lo que mostró que estaba compuesto únicamente por hidrógeno y dióxido de carbono (apartado 2.4.4). Respecto a los perfiles del reactor se puede observar al igual que en el reactor sin control de pH, en las primeras 50 horas, no hay producción de biogás y la bacteria crece consumiendo parte del lactato. A partir de la hora 50, comienza el consumo de lactosa, la producción de ácidos orgánicos y el crecimiento del microorganismo en paralelo con la producción de biogás.
Para los experimentos con suero sintético y solución fosfato (con y sin control de pH), no se observó acumulación de glucosa en el medio lo que indica que este sustrato es consumido inmediata y preferencialmente por las bacterias.

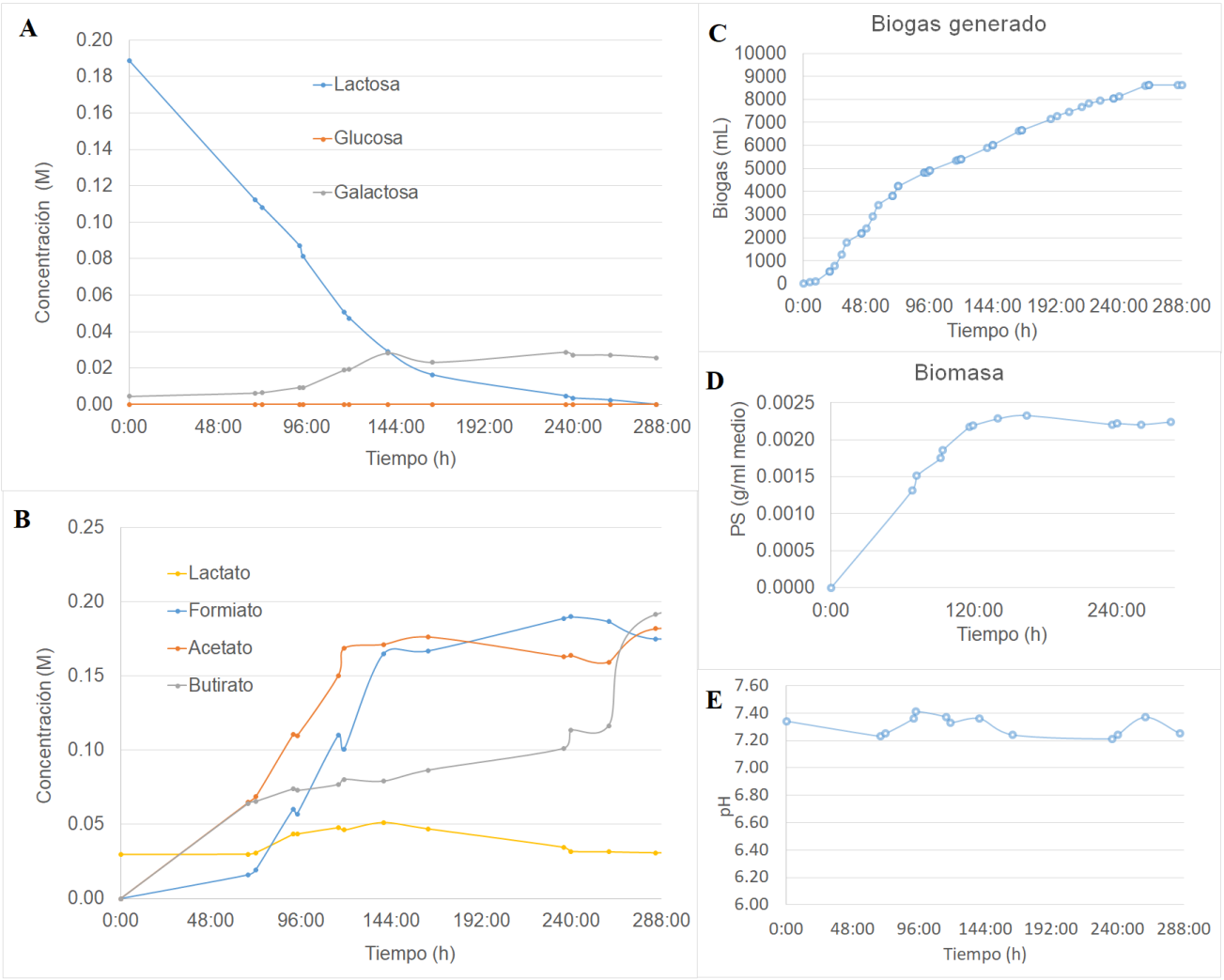
La figura 5-6 presenta los resultados obtenidos para el reactor de suero de leche industrial con control de pH. En esta figura se observa que:

- La producción de biogás comenzó a nueve horas después del inicio del experimento (figura 5-6 C). Para este experimento el comienzo de la producción de biogás fue más rápido, respecto a los experimentos con suero sintético. Esto debido a que el medio del inoculo se complementó con lactosa. Esta adaptación se hizo con el propósito de disminuir el tiempo total del experimento, por limitaciones de tiempo en el laboratorio.

La producción de biogás se llevó a cabo en dos etapas (figura 5-6 C):

  - La primera etapa entre 9 y 72 horas, en la cual se obtuvo una velocidad de producción de biogás de 66 ml h^{-1} hasta un volumen de biogás de 4200 ml.
  - La segunda etapa de 72 hasta 263 horas, la velocidad de producción fue de 23 ml h^{-1}. Hasta el volumen final de 8629 ml de biogás.
- Respecto a la concentración de azucares (figura 5-6A) se observa que:
  - Al finalizar el experimento se consumió 100% de la lactosa presente en el medio inicial, 279 mmoles.
  - La concentración final de galactosa obtenida 26 mM es 7 veces menor a la que se espera.

Figura 5-6 Gráficos reactor suero industrial 1 L con control de pH. *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ con Solución Fosfato
A: Consumo y producción de azúcares en el medio
B: Consumo y producción de ácidos orgánicos en el medio
C: Cinética de producción de biogás.
D: Variación del peso seco del medio en el tiempo.
E: pH



- Hubo producción de ácidos orgánicos:
  - Acido butírico: concentración máxima 198 mM, concentración final 160mM.
  - Ácido acético: concentración final 182 mM.
  - Ácido fórmico: concentración final 175 mM.

- Ácido láctico: máxima concentración 77 mmoles en un tiempo de 140 horas. A continuación, se consumió este ácido hasta llegar a una concentración en el medio de 30mM

Para este experimento también se encontró contaminación con *Clostridium intestinale*. En este reactor también se observa producción de ácidos orgánicos, la cual inició al tiempo que la producción de hidrógeno. El consumo de lactosa empezó inmediatamente se inició el experimento, mientras que no se observó consumo del lactato y en cambio se evidenció su acumulación hasta una concentración de 50 mM.

El consumo de ácidos orgánicos que se observa en las gráficas 5-6B corrobora la influencia de la bacteria fotosintética en la producción de hidrógeno pues solo estas son capaces de consumir ácidos orgánicos bajo las condiciones experimentales [25,30].

Debido a la presencia de *Clostridium intestinale* en el medio la producción de hidrógeno no se puede considerar resultado de un proceso de fotofermentación sino de un proceso de producción integrado entre la fermentación oscura y la fotofermentación. Este sistema de co-cultivo generado en los reactores da una alternativa nueva a evaluar.

Una característica de interés obtenida en los experimentos realizados son las altas tasas de producción de ácidos orgánicos. Para el reactor con solución fosfato y sin control de pH se obtuvo una concentración final de ácido fórmico de 183 mM. Para el reactor con control de pH la concentración final de ácido butírico fue de 193 mM. Para el reactor de suero industrial la producción de ácidos orgánicos fue 198 mM, 182 mM y 175 mM para los ácidos butírico, acético y fórmico. Al consultar la bibliografía, los estudios realizados sobre producción de hidrógeno mediante fermentación presentan concentraciones finales de ácidos orgánicos no superiores a 100 mM [170,171]. Por tanto, los ácidos orgánicos presentes en este medio final pueden ser utilizados, después de hacerle ciertas adaptaciones, para alimentar una nueva etapa de fotofermentación.

Para comparar los resultados obtenidos con otros estudios es necesario analizar las productividades y eficiencias de los experimentos teniendo en cuenta que es una producción integrada. Para efecto de los cálculos, es importante tener en cuenta que en la fermentación oscura los rendimientos máximos encontrados en bibliografía son 4 moles de H_2 por mol de glucosa y 2.6 moles de H_2 por mol de galactosa (6.6 moles de H_2 por mol de

lactosa), esto se debe a la limitación termodinámica causadas por la producción de ácidos orgánicos[158,159,172]. Posteriormente estos ácidos serían utilizados por la bacteria fotosintética para producir H_2 y CO_2 por lo cual para calcular el rendimiento máximo se considera que al final del proceso se debería convertir toda la lactosa y el lactato en este biogás. De esta forma el rendimiento máximo para el medio de cultivo es 12 moles de H_2 por mol de lactosa y 6 moles de H_2 por mol de lactato.

Al comparar las productividades volumétricas con estudios previos (tabla 1-3 y tabla 1-5), los valores obtenidos son similares a los resultados de otros procesos de producción integrada de hidrógeno. Y en el caso del experimento con suero industrial la productividad es mayor que las presentadas en la tabla 1-3 para procesos de producción integrada combinada [85,87]. Sin embargo, al comparar los rendimientos producto-sustrato $Y_{P/S}$, son menores a los reportados en la bibliografía. Esto se debe a las altas concentraciones de ácidos orgánicos producidos que quedaron en el medio sin convertir en H_2.

Los resultados indican que para mejorar el rendimiento global es necesario aprovechar los ácidos que quedaron en el medio para producir hidrógeno en una etapa adicional de fotofermentación. Además, es importante estudiar la producción de hidrógeno mediante la fermentación oscura para determinar las condiciones para las cuales se obtendrían los máximos rendimientos y así posteriormente fusionar los dos procesos (fermentación oscura y fotofermentación), en co-cultivo o por etapas [78].

5.4 Conclusiones

- Es posible producir hidrógeno a partir de suero de leche con una concentración de 90% (v/v) mediante un proceso integrado de fotofermentación y fermentación oscura.
- Se determinó que la bacteria tiene predilección por el sustrato glucosa el cual consume inmediatamente por lo que no hay acumulación visible en el medio.
- La distribución de la luz sobre el reactor es una variable importante en el proceso de producción de hidrógeno, que afecta la productividad del proceso.
- La preparación de un inoculo con lactosa acelera la producción de hidrógeno ya que la bacteria tiene listo el mecanismo metabólico para consumir la lactosa al iniciar los experimentos.

- Debido a la producción elevada de ácidos orgánicos, los rendimientos producto sustrato ($\mathbf{Y_{P/S}}$) de los experimentos son bajos pues una parte de la lactosa presente en el medio se utiliza para producir estos compuestos en vez de H_2.
- El uso de control de pH, aumento la producción total de hidrógeno en 15%, incremento el consumo total de lactosa de 88 a 95% y dio mejores productividades.

6. Conclusiones generales y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- Fue posible obtener una metodología de producción de hidrógeno mediante fotofermentación utilizando como sustrato suero de leche industrial y la bacteria *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ.
- La aplicación de la metodología de diseño de experimentos (DOE) proporcionó modelos que representan adecuadamente el efecto de las variables sobre producción de hidrógeno en reactores por lotes. Mediante estos modelos se pudo encontrar las condiciones que favorecen la producción de hidrógeno tanto para el lactosuero sintético como para el suero de leche industrial.
- Al comparar las dos cepas estudiadas se encontró que la cepa IR3::LacZ presenta mejores producciones de hidrógeno para las condiciones nutricionales proporcionadas por el suero industrial.
- La acción de las soluciones amortiguadoras es limitada ya que no pueden controlar el pH durante todo el experimento. El pH cambia debido a la acumulación de ácidos orgánicos en el medio.
- Para las condiciones de mayor producción de hidrógeno, la bacteria tiene predilección por el sustrato lactosa, el cual consume primero. El lactato es consumido posteriormente o queda en el medio.
- La adición de una etapa de homofermentación en el pretratamiento del suero industrial mejora la productividad y producción total de hidrógeno.

6.2 Recomendaciones

6.2.1 Suero sintético

- Para los experimentos con suero sintético se recomienda ampliar el área de estudio, cambiando los intervalos de algunas variables. Debido a que el proyecto se fundamenta en el uso del suero de leche como sustrato los intervalos de estudio de las variables se seleccionaron según la concentración que este tiene. Sin embargo, las mejores condiciones para la producción de biogás en algunas variables son los extremos de los intervalos y por esta razón no se puede determinar si hay una concentración fuera del intervalo que proporcionaría mejores resultados.

6.2.2 Suero Industrial

- Para los experimentos realizados con suero industrial, la principal dificultad fue el pretratamiento del suero ya que en algunas ocasiones las condiciones finales variaban drásticamente. Se recomienda cuando se va a trabajar con un producto como este contar con los equipos especializados ya que esto ayuda a evitar contaminaciones y permite que las condiciones tras el pretratamiento sean reproducibles.
- Se recomiendo buscar y trabajar con suero de leche desproteinizado en polvo pues esto permitiría disminuir las etapas del pretratamiento.
- Debido a que el medio final contiene ácido láctico, se recomienda utilizar la bacteria *Rhodobacter capsulatus* cepa IR3 sin recombinación para utilizar el lactato en la producción de hidrógeno, ya sea proceso de co-cultivo con la cepa recombinante o en una etapa posterior.

6.2.3 Proceso de escalado

- Estudiar el proceso de fermentación oscura aparte del de fotofermentación para determinar las condiciones en las que se produce mayor cantidad de hidrógeno y asó posteriormente unir el proceso de fotofermentación mediante co-cultivo o por etapas.

- Utilizar los medios finales de los reactores con contaminación para hacer pruebas de fotofermentación con el fin de utilizar los ácidos orgánicos generados para producir hidrógeno.
- Trabajar con un diseño de reactor que mejore la distribución de la luz sobre la bacteria.
- Para determinar si hay el mismo tipo de contaminación en los tres reactores, se enviaron muestras de los experimentos para un análisis microbiológico. Luego de obtener los resultados se recomienda trabajar con estos microorganismos y mejorar la producción de hidrógeno y los rendimientos para la fermentación oscura.

7. Bibliografía

[1] IChemE. A Roadmap for 21st Century Chemical Engineering 2007.

[2] Kapdan IK, Kargi F. Bio-hydrogen production from waste materials. Enzyme Microb Technol 2006;38:569–82. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.09.015.

[3] Andrews J, Shabani B. Where does hydrogen fit in a sustainable Energy Economy? Procedia Eng 2012;49:15–25. doi:10.1016/j.proeng.2012.10.107.

[4] Singh S, Jain S, Ps V, Tiwari AK, Nouni MR, Pandey JK, et al. Hydrogen: A sustainable fuel for future of the transport sector. Renew Sustain Energy Rev 2015;51:623–33. doi:10.1016/j.rser.2015.06.040.

[5] IEA. WEO 2015 Special Report on Energy and Climate Change - Executive Summary - UK version. 2015.

[6] García Arbeláez C, Vallejo López G, Higgins M lou, Escobar EM. El acuerdo de parís, Así actuará Colombia frente al cambio climático. 2016.

[7] IEA. Technology Roadmap Hydrogen and Fuel cells. 2013. doi:10.1007/SpringerReference_7300.

[8] Defterios J. Productores de petróleo, en una tormenta perfecta - Economía - CNNExpansion.com. CNN 2015.

[9] Alexander DT, Bradley J, Dicks AL. AUSTRALIAN HYDROGEN ACTIVITY 2008. Aust Gov Dep Resour Energy Tour 2008.

[10] Ni M, Leung M, Sumathy K, Leung D. Potential of renewable hydrogen production for energy supply in Hong Kong. J Hydrog Energy 2006;31:1401–1412.

[11] Choi J, Ahn Y. Characteristics of biohydrogen fermentation from various substrates. Int J Hydrogen Energy 2014;39:3152–9. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.12.050.

[12] European Commission. The European Hydrogen Energy Roadmap. Brussels, Belgium: 2008.

[13] Boran E, Özgür E, Yücel M, Gündüz U, Eroglu I. Biohydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* Hup− mutant in pilot solar tubular photobioreactor. Int J Hydrogen Energy 2012;37:16437–45. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.02.171.

[14] He D, Bultel Y, Magnin J, Roux C, Willison J. Hydrogen photosynthesis by and its coupling to a PEM fuel cell. J Power Sources 2005;141:19–23. doi:10.1016/j.jpowsour.2004.09.002.

[15] Dutta S. A review on production, storage of hydrogen and its utilization as an energy resource. J Ind Eng Chem 2014;20:1148–56. doi:10.1016/j.jiec.2013.07.037.

[16] IEA. Renewable Energy Outlook. 2013.

[17] Acar C, Dincer I. Comparative assessment of hydrogen production methods from renewable and non-renewable sources. Int J Hydrogen Energy 2014;39:1–12. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.10.060.

[18] Dincer I. Green methods for hydrogen production. Int J Hydrogen Energy 2012;37:1954–71. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.03.173.

[19] Wünschiers R, Lindblad P. Hydrogen in education—a biological approach. Int J Hydrogen Energy 2002;27:1131–40.

[20] Remme U, IEA IEA, OECD. Hydrogen Roadmap: Analytical approach of the supply side modelling. 2013.

[21] PNUD, Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. Primer autobús de hidrógeno de América Latina recorre las calles de Sao Paulo 2009.

[22] Rocha L. Buses eléctricos: en 2020, en 20 ciudades latinoamericanas. La Nac Buenos Aires 2015. http://www.lanacion.com.ar/1779821-buses-electricos-en-2020-en-20-ciudades-de-america-latina (accessed September 10, 2015).

[23] Alcaldía Mayor de Bogotá. Alcaldes Latinoamericanos del C40 se comprometen a implementar 40 mil buses eléctricos 2015.

[24] Williams C. Revealed: the first hydrogen-powered battery that will charge your Apple iPhone for a week. Telegr 2015.

[25] Melis A, Melnicki M. Integrated biological hydrogen production. Int J Hydrogen Energy 2006;31:1563–73. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.06.038.

[26] Nath K, Das D. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. Appl Microbiol Biotechnol 2004;65:520–529.

[27] Basak N, Jana AK, Das D, Saikia D. Photofermentative molecular biohydrogen production by purple-non-sulfur (PNS) bacteria in various modes: The present progress and future perspective. Int J Hydrogen Energy 2014;39:6853–71. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.02.093.

[28] Su H, Cheng J, Zhou J, Song W, Cen K. Improving hydrogen production from cassava starch by combination of dark and photo fermentation. Int J Hydrogen Energy 2009;34:1780–6. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.12.045.

[29] Sevinç P, Gündüz U, Eroglu I, Yücel M. Kinetic analysis of photosynthetic growth, hydrogen production and dual substrate utilization by *Rhodobacter capsulatus*. Int J Hydrogen Energy 2012;37:16430–6. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.02.176.

[30] Rupprecht J, Hankamer B, Mussgnug JH, Ananyev G, Dismukes C, Kruse O. Perspectives and advances of biological H2 production in microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol 2006;72:442–449. doi:10.1007/s00253-006-0528-x.

[31] Bedoya A, Castrillón JC, Ramírez JE, Vásquez JE, Zabala MA. Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. Dyna 2008;75:137–157.

[32] Salih FM. Improvement of Hydrogen Photoproduction From E. Coli Pre-Treated Cheese Whey. Hydrog Energy 1989;14:661–3.

[33] de Wit JN. Lecturer's Handbook on whey and whey products. First. 2001.

[34] Mojica F, Trujillo R, Castellanos D, Bernal N. Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico de la cadena láctea colombiana, Bogotá: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; 2007.

[35] Valencia D, Ramírez M, Denicia V, Castillo R, Leticia M, Valencia, E, et al. La Industria de la Leche y la Contaminación del Agua. Rev Elem 2009;16:27–31.

[36] Universidad Nacional de Colombia SM, Corpoica, Colombia UL de, Lacteo CN. Utilización Actual del lactosuero en Colombia: Valorización del suero de quesería. 2013.

[37] FAO. Cheese production Statistics. Cheese Prod All Kinds 2014. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QP.

[38] Castillo P, Magnin J-P, Velasquez M, Willison J. Modeling And Optimization of Hydrogen Production By The Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter capsulatus* By The Methodology Of Design Of Experiments (DOE): Interaction Between Lactate Concentration And Light Luminosity. Energy Procedia 2012;29:357–66. doi:10.1016/j.egypro.2012.09.042.

[39] Vignais P, Magnin J, Willison J. Increasing biohydrogen production by metabolic engineering. Int J Hydrogen Energy 2006;31:1478–83. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.06.013.

[40] Das D. Advances in biohydrogen production processes: an approach towards commercialization. Int J Hydrogen Energy 2009;34:7349–7357.

[41] Holladay JD, Hu J, King DL, Wang Y. An overview of hydrogen production technologies. Catal Today 2009;139:244–60. doi:10.1016/j.cattod.2008.08.039.

[42] Tayade P, Sapkal V, Rode C, Sapkal R. Conventional ethanol reforming technology. Developments for the production of hyrogen. Int J Adv Eng Technol 2012;3:436–50.

[43] Ozbilen A, Dincer I, Rosen M a. Comparative environmental impact and efficiency assessment of selected hydrogen production methods. Environ Impact Assess Rev 2013;42:1–9. doi:10.1016/j.eiar.2013.03.003.

[44] Fernández C, Cuetos MJ, Martínez EJ, Gómez X. Thermophilic anaerobic digestion of cheese whey: Coupling H 2 and CH 4 production. Biomass and Bioenergy 2015;81:55–62. doi:10.1016/j.biombioe.2015.05.024.

[45] Schröder C, Selig M, Schönheit P. Glucose fermentation to acetate, CO2 and H2 in the anaerobic hyperthermophilic eubacterium Thermotoga maritima: involvement of the Embden-Meyerhof pathway. Arch Microbiol 1994;161:460–70. doi:10.1007/BF00307766.

[46] Roy S, Kumar K, Ghosh S, Das D. Thermophilic biohydrogen production using pre-treated algal biomass as substrate. Biomass and Bioenergy 2014;61:157–66. doi:10.1016/j.biombioe.2013.12.006.

[47] Zhou P, Wang Y, Gao R, Tong J, Yang Z. Transferring [NiFe] hydrogenase gene from Rhodopseudomonas palustris into E. coli BL21(DE3) for improving hydrogen production. Int J Hydrogen Energy 2015;40:4329–36. doi:10.1016/j.ijhydene.2015.01.171.

[48] Vignais P, Colbeau A. Molecular biology of microbial hydrogenases. Curr Issues Mol Biol 2004:159–88.

[49] Prince RC, Kheshgi HS. The photobiological production of hydrogen: potential efficiency and effectiveness as a renewable fuel. Crit Rev Microbiol 2005;31:19–31.

[50] Basak N, Das D. The Prospect of Purple Non-Sulfur (PNS) Photosynthetic Bacteria for Hydrogen Production: The Present State of the Art. World J Microbiol Biotechnol

2006;23:31–42. doi:10.1007/s11274-006-9190-9.

[51] Pandey A, Chang J-S, Hallenbeck PC, Larroche C. Biohydrogen. Biohydrogen, 2013, p. 75–102.

[52] Hu Y, Ribbe MW. Nitrogenase assembly. Biochim Biophys Acta 2013;1827:1112–22. doi:10.1016/j.bbabio.2012.12.001.

[53] Wang D, Zhang Y, Welch E, Li J, Roberts GP. Elimination of Rubisco alters the regulation of nitrogenase activity and increases hydrogen production in Rhodospirillum rubrum. Int J Hydrogen Energy 2010;35:7377–85. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.04.183.

[54] Rees DC, Howard JB. Nitrogenase: standing at the crossroads. Curr Opin Chem Biol 2000;4:559–566.

[55] Taiz L, Zeiger E. Plant Physiology. Fifth Edit. SINAUER; 2010.

[56] Riis T, Hagen E, Vie PJS, Ulleberg Ø. Hydrogen production–gaps and priorities. IEA Hydrog Implement … 2005.

[57] Manish S, Banerjee R. Comparison of biohydrogen production processes. Int J Hydrogen Energy 2008;33:279–86. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.07.026.

[58] Dutta D, De D. Hydrogen production by Cyanobacteria. Microb Cell 2005;4:36.

[59] Androga DD, Sevinç P, Koku H, Yücel M, Gündüz U, Eroglu I. Optimization of temperature and light intensity for improved photofermentative hydrogen production using *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710. Int J Hydrogen Energy 2014;39:2472–80. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.11.114.

[60] Ghosh D, Sobro IF, Hallenbeck PC. Optimization of the hydrogen yield from single-stage photofermentation of glucose by *Rhodobacter capsulatus* JP91 using response surface methodology. Bioresour Technol 2012;123:199–206. doi:10.1016/j.biortech.2012.07.061.

[61] Zürrer H, Bachofen R. Hydrogen production by the photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum. Appl Environ Microbiol 1979;37:789–93.

[62] Zürrer H, Bachofen R. Hydrogen production from lactate and lactate-containing wastes by the photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum. Stud Environ Sci 1981;Volume 9:31–6.

[63] Azbar N, Cetinkaya Dokgoz FT. The effect of dilution and l-malic acid addition on bio-hydrogen production with Rhodopseudomonas palustris from effluent of an acidogenic anaerobic reactor. Int J Hydrogen Energy 2010;35:5028–33. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.10.044.

[64] Azbar N, Çetinkaya Dokgöz FT, Keskin T, Korkmaz KS, Syed HM. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. Int J Hydrogen Energy 2009;34:7441–7. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.04.032.

[65] Castelló E, García y Santos C, Iglesias T, Paolino G, Wenzel J, Borzacconi L, et al. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. Int J Hydrogen Energy 2009;34:5674–82. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.05.060.

[66] Venetsaneas N, Antonopoulou G, Stamatelatou K, Kornaros M, Lyberatos G. Using

cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. Bioresour Technol 2009;100:3713–7. doi:10.1016/j.biortech.2009.01.025.

[67] Eroğlu E, Gündüz U, Yücel M. Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. J Hydrog 2004;29:163–171.

[68] Eroğlu E, Eroğlu İ, Gündüz U. Biological hydrogen production from olive mill wastewater with two-stage processes. J Hydrog 2006;31:1527–1535.

[69] Abo-Hashesh M, Desaunay N, Hallenbeck P. High yield single stage conversion of glucose to hydrogen by photofermentation with continuous cultures of *Rhodobacter capsulatus* JP91. Bioresour Technol 2013;128:513–7. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.091.

[70] Ma C, Wang X, Guo L, Wu X, Yang H. Enhanced photo-fermentative hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* with pigment content manipulation. Bioresour Technol 2012;118:490–5. doi:10.1016/j.biortech.2012.04.105.

[71] Hallenbeck PC, Abo-Hashesh M, Ghosh D. Strategies for improving biological hydrogen production. Bioresour Technol 2012;110:1–9. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.103.

[72] Arimi MM, Knodel J, Kiprop A, Namango SS, Zhang Y, Geißen SU. Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: A review. Biomass and Bioenergy 2015;75:101–18. doi:10.1016/j.biombioe.2015.02.011.

[73] Levin DB, Pitt L, Love M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. Int J Hydrogen Energy 2004;29:173–85. doi:10.1016/S0360-3199(03)00094-6.

[74] Argun H, Kargi F, Kapdan IK. Hydrogen production by combined dark and light fermentation of ground wheat solution. Int J Hydrogen Energy 2009;34:4305–11. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.03.033.

[75] Chen W, Chen S, Kumarkhanal S, Sung S. Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. Int J Hydrogen Energy 2006;31:2170–8. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.02.020.

[76] Gupta M, Velayutham P, Elbeshbishy E, Hafez H, Khafipour E, Derakhshani H, et al. Co-fermentation of glucose, starch, and cellulose for mesophilic biohydrogen production. Int J Hydrogen Energy 2014:1–10. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.10.079.

[77] Parihar RK, Upadhyay K. Production of Bio-Hydrogen Gas from Wastewater by Anaerobic Fermentation Process: A Review. Int J Chem Stud IJCS 2015;7:7–14.

[78] Rai PK, Singh SP. Integrated dark- and photo-fermentation: Recent advances and provisions for improvement. Int J Hydrogen Energy 2016;41:19957–71. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.08.084.

[79] Yetis M, Gündüz U, Eroglu I, Yücel M, Türker L. Photoproduction of hydrogen from sugar refinery wastewater by Rhodobacter sphaeroides OU 001. Int J Hydrogen Energy 2000;25:1035–1041. doi:10.1016/S0360-3199(00)00027-6.

[80] Zhu H, Suzuki T, Tsygankov AA, Asada Y, Miyake J. Hydrogen production from tofu wastewater by Rhodobacter sphaeroides immobilized in agar gels. Int J Hydrogen Energy 1999;24:305–10. doi:10.1016/S0360-3199(98)00081-0.

[81] Castillo Moreno P. experimental de la producción de hidrógeno a partir de suero de

leche como sustrato en la fotosíntesis de microorganismos recombinados de Rhodobacter. 2012.

[82] Zhu Z, Shi J, Zhou Z, Hu F, Bao J. Photo-fermentation of Rhodobacter sphaeroides for hydrogen production using lignocellulose-derived organic acids. Process Biochem 2010;45:1894–8. doi:10.1016/j.procbio.2010.08.017.

[83] Anam K, Habibi MS, Harwati TU, Susilaningsih D. Photofermentative hydrogen production using Rhodobium marinum from bagasse and soy sauce wastewater. Int J Hydrogen Energy 2012;37:15436–42. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.06.076.

[84] Kawaguchi H, Hashimoto K, Hirata K, Miyamoto K. H2production from algal biomass by a mixed culture of Rhodobium marinum A-501 and Lactobacillus amylovorus. J Biosci Bioeng 2001;91:277–82. doi:10.1016/S1389-1723(01)80134-1.

[85] Zagrodnik R, Łaniecki M. Hydrogen production from starch by co-culture of Clostridium acetobutylicum and Rhodobacter sphaeroides in one step hybrid dark- and photofermentation in repeated fed-batch reactor. Bioresour Technol 2016;224:298–306. doi:10.1016/j.biortech.2016.10.060.

[86] Yokoi H, Saitsu a, Uchida H, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y. Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue. J Biosci Bioeng 2001;91:58–63.

[87] Yokoi H, Mori S, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y. H2 production from starch by a mixed culture of Clostridium butyricum and Rhodobacter sp. M 19. Biotechnol Lett 1998;20:895–899.

[88] Yang P, Zhang R, Mcgarvey J, Benemann J. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. Int J Hydrogen Energy 2007;32:4761–71. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.07.038.

[89] He D, Bultel Y, Magnin J-P, Willison JC. Kinetic analysis of photosynthetic growth and photohydrogen production of two strains of *Rhodobacter capsulatus*. Enzyme Microb Technol 2006;38:253–9. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.06.012.

[90] Eroglu I. Identification of by-products in hydrogen producing bacteria; Rhodobacter sphaeroides OU 001 grown in the waste water of a sugar refinery. Mar Bioprocess Eng 1999;35:125–131.

[91] Kars G, Gündüz U, Yücel M, Türker L, Eroglu İ. Hydrogen production and transcriptional analysis of nif D, nif K and hup S genes in Rhodobacter sphaeroides OU 001 grown in media. J Hydrog Energy 2006;31:1536–1544.

[92] Fascetti E, D'addario E. Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes. J Hydrog 1998;23:753–760.

[93] Zhu H, Fang H, Zhang T, Beaudette L. Effect of ferrous ion on photo heterotrophic hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides. Int J Hydrogen Energy 2007;32:4112–4118.

[94] Vrati S, Verma J. Production of molecular hydrogen and single cell protein by Rhodopseudomonas capsulata from cow dung. J Ferment Technol 1983;61:157–162.

[95] Willison JC, Madern D, Vignais PM. Increased photoproduction of hydrogen by non-autotrophic mutants of Rhodopseudomonas capsulata. Biochem J 1984;219:593.

[96] Shi XY, Yu HQ. Continuous production of hydrogen from mixed volatile fatty acids with Rhodopseudomonas capsulata. Int J Hydrogen Energy 2006;31:1641–1647.

[97] Vincenzini M, Balloni W, Mannelli D, Florenzano G. A bioreactor for continuous treatment of waste waters with immobilized cells of photosynthetic bacteria. Experientia 1981;37:710–712.

[98] Akhlaghi M, Boni MR, De Gioannis G, Muntoni A, Polettini A, Pomi R, et al. A parametric response surface study of fermentative hydrogen production from cheese whey. Bioresour Technol 2017;244:473–83. doi:10.1016/j.biortech.2017.07.158.

[99] Prazeres AR, Carvalho F, Rivas J. Cheese whey management: A review. J Environ Manage 2012;110:48–68. doi:10.1016/j.jenvman.2012.05.018.

[100] Poveda E. Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. Rev Chil Nutr 2013;40:397–403.

[101] Panesar PS, Kennedy JF, Gandhi DN, Bunko K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. Food Chem 2007;105:1–14. doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.035.

[102] HernándezrojasF M, Vélez-Ruiz JF. Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. Temas Sel Ing Aliment 2014;8:13–22.

[103] Fachin L, Viotto WH. Effect of pH and heat treatment of cheese whey on solubility and emulsifying properties of whey protein concentrate produced by ultrafiltration. Int Dairy J 2005;15:325–32. doi:10.1016/j.idairyj.2004.07.015.

[104] Pelegrine DHG, Gasparetto C a. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. LWT - Food Sci Technol 2005;38:77–80. doi:10.1016/j.lwt.2004.03.013.

[105] Anandharamakrishnan C, Rielly CD, Stapley AGF. Loss of solubility of α-lactalbumin and β-lactoglobulin during the spray drying of whey proteins. LWT - Food Sci Technol 2008;41:270–7. doi:10.1016/j.lwt.2007.03.004.

[106] Carbonaro M, Lucarini M, Di Lullo G. Composition and calcium status of acid whey from pasteurized, UHT-treated and in-bottle sterilized milk. Nahrung 2000;44:422–5. doi:10.1002/1521-3803(20001201)44:6<422::AID-FOOD422>3.0.CO;2-D.

[107] Ju ZY, Kilara A. Effects of Preheating on Properties of Aggregates and of Cold-Set. Agric Food Chem 1998;8561:3604–8.

[108] Wijayanti HB, Bansal N, Deeth HC. Stability of Whey Proteins during Thermal Processing: A Review. Compr Rev Food Sci Food Saf 2014;13:1235–51. doi:10.1111/1541-4337.12105.

[109] European Commission Eurostat. Milk and milk product statistics. 2015.

[110] Batista KA, Silva CNS, Fernandes PM, Campos ITN, Fernandes KF. Development of a new bioaffinity stationary phase for lactose removal using a lactose-binding lectin immobilized onto polyaniline. Sep Purif Technol 2017;185:54–60. doi:10.1016/j.seppur.2017.05.019.

[111] Wu TY, Hay JXW, Kong LB, Juan JC, Jahim JM. Recent advances in reuse of waste material as substrate to produce biohydrogen by purple non-sulfur (PNS) bacteria. Renew Sustain Energy Rev 2012;16:3117–22. doi:10.1016/j.rser.2012.02.002.

[112] Ferchichi M, Crabbe E, Gil G-H, Hintz W, Almadidy A. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. J Biotechnol 2005;120:402–9. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.05.017.

[113] Kargi F, Eren NS, Ozmihci S. Bio-hydrogen production from cheese whey powder (CWP) solution: Comparison of thermophilic and mesophilic dark fermentations. Int J Hydrogen Energy 2012;37:8338–42. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.02.162.

[114] Davila-Vazquez G, Cota-Navarro CB, Rosales-Colunga LM, de León-Rodríguez A, Razo-Flores E. Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. Int J Hydrogen Energy 2009;34:4296–304. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.02.063.

[115] Ottaviano LM, Ramos LR, Botta LS, Amancio Varesche MB, Silva EL. Continuous thermophilic hydrogen production from cheese whey powder solution in an anaerobic fluidized bed reactor: Effect of hydraulic retention time and initial substrate concentration. Int J Hydrogen Energy 2017;42:4848–60. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.11.168.

[116] Seifert K, Waligorska M, Laniecki M. Hydrogen generation in photobiological process from dairy wastewater. Int J Hydrogen Energy 2010;35:9624–9. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.07.015.

[117] Rai PK, Asthana RK, Singh SP. Optimization of photo-hydrogen production based on cheese whey spent medium. Int J Hydrogen Energy 2013;39:7597–603. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.09.011.

[118] Zürrer H, Bachofen R. Hydrogen production from lactate and lactate-containing wastes by the photosynthetic bacterium rhodospirillum rubrum. Stud Environ Sci 1981;9:31–6. doi:10.1016/S0166-1116(08)71349-9.

[119] Weaver PF, Wall JD, Gest H. Characterization of Rhodopseudomonas capsulata. Arch Microbiol 1975;105:207–16.

[120] Vignais PM, Elsen S, Colbeau A. Transcriptional regulation of the uptake [NiFe]hydrogenase genes in *Rhodobacter capsulatus*. Biochem Soc Trans 2005;33:28–32. doi:10.1042/BST0330028.

[121] Colbeau A, Vignais PM. Use of hupS::lacZ gene fusion to study regulation of hydrogenase expression in *Rhodobacter capsulatus*: Stimulation by H2. J Bacteriol 1992;174:4258–64.

[122] Kolthoff I. A new set of buffer mixtures that can be prepared without the use of standardized acid or base. J Biol Chem 1925:135–41.

[123] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein Mesurement with the Folin Phenol Reagent. Readings 1951;193:265–75. doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4.

[124] Antony J. Design of Experiments for Engineers and Scientists. Second. Elsevier Ltd; 2014.

[125] Gatti C. Design of Experiments for Reinforcement Learning. vol. 53. 2015. doi:10.1007/978-3-319-12197-0.

[126] Susilaningsih D, Sirait LS, Anam K, Habibi MS, Prasetya B. Possible application of biohydrogen technologies as electricity sources in Indonesian remote areas. Int J Hydrogen Energy 2014;39:19400–5. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.08.073.

[127] Azwar MY, Hussain M a., Abdul-Wahab a. K. Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. Renew Sustain Energy Rev 2014;31:158–73. doi:10.1016/j.rser.2013.11.022.

[128] Ghosh S, Dairkee UK, Chowdhury R, Bhattacharya P. Hydrogen from food processing wastes via photofermentation using Purple Non-sulfur Bacteria (PNSB) - A review. Energy Convers Manag 2016. doi:10.1016/j.enconman.2016.09.001.

[129] Keskin T, Abo-Hashesh M, Hallenbeck PC. Photofermentative hydrogen production from wastes. Bioresour Technol 2011;102:8557–68. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.004.

[130] Singh L, Wahid ZA. Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review. J Ind Eng Chem 2015;21:70–80. doi:10.1016/j.jiec.2014.05.035.

[131] Bičáková O, Straka P. Production of hydrogen from renewable resources and its effectiveness. Int J Hydrogen Energy 2012;37:11563–78. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.05.047.

[132] Kalinci Y, Hepbasli A, Dincer I. Biomass-based hydrogen production: A review and analysis. Int J Hydrogen Energy 2009;34:8799–817. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.08.078.

[133] Kothari R, Singh DP, Tyagi V V., Tyagi SK. Fermentative hydrogen production - An alternative clean energy source. Renew Sustain Energy Rev 2012;16:2337–46. doi:10.1016/j.rser.2012.01.002.

[134] Ozgur E, Uyar B, Ozturk Y, Yucel M, Gunduz U, Eroglu I. Biohydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* on acetate at fluctuating temperatures. Resour Conserv Recycl 2010;54:310–4. doi:10.1016/j.resconrec.2009.06.002.

[135] Shi X, Yu H. Optimization of glutamate concentration and pH for H2 production from volatile fatty acids by Rhodopseudomonas capsulata. Lett Appl Microbiol 2005;40:401–406.

[136] Shi XY, Li WW, Yu HQ. Key parameters governing biological hydrogen production from benzoate by Rhodopseudomonas capsulata. Appl Energy 2014;133:121–6. doi:10.1016/j.apenergy.2014.07.087.

[137] Khanal S. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. Int J Hydrogen Energy 2003;29:1123–31. doi:10.1016/j.ijhydene.2003.11.002.

[138] Lazaro CZ, Varesche MBA, Silva EL. Effect of inoculum concentration, pH, light intensity and lighting regime on hydrogen production by phototrophic microbial consortium. Renew Energy 2015;75:1–7. doi:10.1016/j.renene.2014.09.034.

[139] Koku H, Eroglu I, Gündüz U, Yücel M, Türker L, Erolu I, et al. Aspects of the metabolism of hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides. Int J Hydrogen Energy 2002;27:1315–29. doi:10.1016/S0360-3199(02)00127-1.

[140] Tabita FR, Tichi MA. Interactive Control of *Rhodobacter capsulatus* Redox-Balancing Systems during Phototrophic Metabolism. J Bacteriol 2001;183:6344–54. doi:10.1128/JB.183.21.6344.

[141] Pandey A, Srivastava N, Sinha P. Optimization of hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides NMBL-01. Biomass and Bioenergy 2012;37:251–6. doi:10.1016/j.biombioe.2011.12.005.

[142] Seo YH, Yun Y-M, Lee H, Han J-I. Pretreatment of cheese whey for hydrogen production using a simple hydrodynamic cavitation system under alkaline condition. Fuel 2015;150:202–7. doi:10.1016/j.fuel.2015.01.100.

[143] Kushwaha JP, Chandra Srivastava V, Mall ID. Treatment of dairy wastewater by

inorganic coagulants: Parametric and disposal studies. Water Res 2010;44:5867–74. doi:10.1016/j.watres.2010.07.001.

[144] Souza RR, Gimenes ML, Costa SC, Müller CMO. Eliminación de grasas del suero de queso para obtener proteínas y lactosa. Inf Tecnol 2008;19:41–50. doi:10.4067/S0718-07642008000200006.

[145] Liu G, Zhong Q. Removal of milk fat globules from whey protein concentrate 34% to prepare clear and heat-stable protein dispersions. J Dairy Sci 2014;97:6097–106. doi:10.3168/jds.2014-8439.

[146] Kamyabi N. Reconsideration of whey clarification using chitosan and decalciumphosphation using thermal treatment. World Appl Sci J 2011;14:101–5.

[147] Damodaran S. Straightforward process for removal of milk fat globule membranes and production of fat-free whey protein concentrate from cheese whey. J Agric Food Chem 2011;59:10271–6. doi:10.1021/jf201686v.

[148] Adrian J, Bourlier G, SABEL A. Composition minérale du lactosérum. Influence des facteurs technologiques, saisonniers et géographiques. Lait 1980:447–57.

[149] Eroglu E, Gunduz U, Yucel M, Eroglu I. Effect of iron and molybdenum addition on photofermentative hydrogen production from olive mill wastewater. Int J Hydrogen Energy 2011;36:5895–903. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.02.062.

[150] Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzyme Microb Technol 2000;26:87–107. doi:10.1016/S0141-0229(99)00155-6.

[151] Burgess C, O'Connell-Motherway M, Sybesma W, Hugenholtz J, van Sinderen D. Riboflavin Production in Lactococcus lactis: Potential for In Situ Production of Vitamin-Enriched Foods. Appl Enviromental Microbiol 2004;70:5769–77.

[152] Looijesteijn PJ, Trapet L, de Vries E, Abee T, Hugenholtz J. Physiological function of exopolysaccharides produced by Lactococcus lactis. Int J Food Microbiol 2001;64:71–80.

[153] Uyar B, Eroglu I, Yücel M, Gündüz U. Photofermentative hydrogen production from volatile fatty acids present in dark fermentation effluents. Int J Hydrogen Energy 2009;34:4517–23. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.07.057.

[154] Ozgur E, Mars AE, Peksel B, Louwerse A, Yucel M, Gunduz U, et al. Biohydrogen production from beet molasses by sequential dark and photofermentation. Int J Hydrogen Energy 2010;35:511–7. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.10.094.

[155] Macler BA, Pelroy RA, Bassham JA. Hydrogen formation in nearly stoichiometric amounts from glucose by Rhodopseudomonas sphaeroides mutant. J Bacteriol 1979;138:446–52.

[156] Davila-Vazquez G, Alatriste-Mondragón F, de León-Rodríguez A, Razo-Flores E. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. Int J Hydrogen Energy 2008;33:4989–97. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.06.065.

[157] Bundhoo MAZ, Mohee R. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. Int J Hydrogen Energy 2016;41:6713–33. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.03.057.

[158] Sivagurunathan P, Anburajan P, Park JH, Kumar G, Park HD, Kim SH. Mesophilic

biogenic H2 production using galactose in a fixed bed reactor. Int J Hydrogen Energy 2017;42:3658–66. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.07.203.

[159] Kumar G, Park JH, Kim MS, Kim DH, Kim SH. Hydrogen fermentation of different galactose-glucose compositions during various hydraulic retention times (HRTs). Int J Hydrogen Energy 2014;39:20625–31. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.08.137.

[160] De Gioannis G, Friargiu M, Massi E, Muntoni a., Polettini a., Pomi R, et al. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. Int J Hydrogen Energy 2014;39:20930–41. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.10.046.

[161] Kumari S, Das D. Improvement of biohydrogen production using acidogenic culture. Int J Hydrogen Energy 2017;42:4083–94. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.09.021.

[162] Boodhun BSF, Mudhoo A, Kumar G, Kim SH, Lin CY. Research perspectives on constraints, prospects and opportunities in biohydrogen production. Int J Hydrogen Energy 2017:1–11. doi:10.1016/j.ijhydene.2017.04.077.

[163] Patel AK, Vaisnav N, Mathur A, Gupta R, Tuli DK. Whey waste as potential feedstock for biohydrogen production. Renew Energy 2016;98:221–5. doi:10.1016/j.renene.2016.02.039.

[164] Ren N, Guo W, Liu B, Cao G, Ding J. Biological hydrogen production by dark fermentation: Challenges and prospects towards scaled-up production. Curr Opin Biotechnol 2011;22:365–70. doi:10.1016/j.copbio.2011.04.022.

[165] Zgr E, Afsar N, De Vrije T, Ycel M, Gndz U, Claassen PAM, et al. Potential use of thermophilic dark fermentation effluents in photofermentative hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus*. J Clean Prod 2010;18:S23–8. doi:10.1016/j.jclepro.2010.02.020.

[166] Özkan E, Uyar B, Özgür E, Yücel M, Eroglu I, Gündüz U. Photofermentative hydrogen production using dark fermentation effluent of sugar beet thick juice in outdoor conditions. Int J Hydrogen Energy 2012;37:2044–9. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.06.035.

[167] Rashid N, Rehman MSU, Memon S, Ur Rahman Z, Lee K, Han JI. Current status, barriers and developments in biohydrogen production by microalgae. Renew Sustain Energy Rev 2013;22:571–9. doi:10.1016/j.rser.2013.01.051.

[168] Eroglu E, Melis A. Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art. Bioresour Technol 2011;102:8403–13. doi:10.1016/j.biortech.2011.03.026.

[169] Elsayed S, Zhang K. Bacteremia Caused by Clostridium intestinale. J Clin Microbiol 2005;45:2018–20.

[170] Slezak R, Grzelak J, Krzystek L, Ledakowicz S. The effect of initial organic load of the kitchen waste on the production of VFA and H 2 in dark fermentation. Waste Manag 2017;68:610–7. doi:10.1016/j.wasman.2017.06.024.

[171] Lo YC, Chen CY, Lee CM, Chang JS. Photo fermentative hydrogen production using dominant components (acetate, lactate, and butyrate) in dark fermentation effluents. Int J Hydrogen Energy 2011;36:14059–68. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.04.148.

[172] Nagarajan D, Lee DJ, Kondo A, Chang JS. Recent insights into biohydrogen production by microalgae – From biophotolysis to dark fermentation. Bioresour Technol 2017;227:373–87. doi:10.1016/j.biortech.2016.12.104.

A. Anexo: Determinación de la curva peso seco

El procedimiento descrito a continuación se realizó para las 4 cepas con las que se trabajó en la realización del proyecto de Tesis:

1. Obtener una suspensión concentrada de biomasa en el medio de crecimiento RCV (con absorbancia entre 0.9 y 1 a 660 nm).
2. Centrifugar la solución por 5 min a 1300 rpm descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con solución salina 0.9%
3. A partir de la solución concentrada de biomasa realizar diluciones que ajusten lecturas de absorbancia entre 0.2 y 0.8 a 660 nm.
4. Filtrar las diferentes disoluciones obtenías. Previa preparación del filtro cajas Petri (secado y pesado)
5. Secar todas las cajas con sus respectivos filtros en la estufa a 80ºC hasta que no haya variación de peso.
6. Colocar las cajas en el desecador, esperar que se enfríen y luego pesarlos.
7. Determinar el peso de la biomasa presente en cada caja.
8. Expresar la concentración en gramos de biomasa seca por litro de solución (g de biomasa seca L^{-1}).
9. Graficar absorbancia como función de la concentración celular en g de biomasa seca L^{-1}.

Tabla A1 Absorbancia vs Peso seco

***Rhodobacter capsulatus* B10**		***Rhodobacter capsulatus* B10::LacZ**	
DW (660nm)	**DO**	**DW (660nm)**	**DO**
1.70	1.0902	0.0017	0.9069
1.10	0.5697	0.0009	0.493
0.70	0.478	0.0007	0.2717
0.50	0.3096	0.0002	0.2067
***Rhodobacter capsulatus* IR3**		***Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ**	
DW (660nm)	**DO**	**DW (660nm)**	**DO**
1.70	0.9464	0.0013	0.7089
1.00	0.5631	0.0008	0.465
0.70	0.2591	0.0002	0.101
0.50	0.2524	0.0002	0.1194

Figura A1 Gráficas regresión lineal para curvas de calibración del peso seco

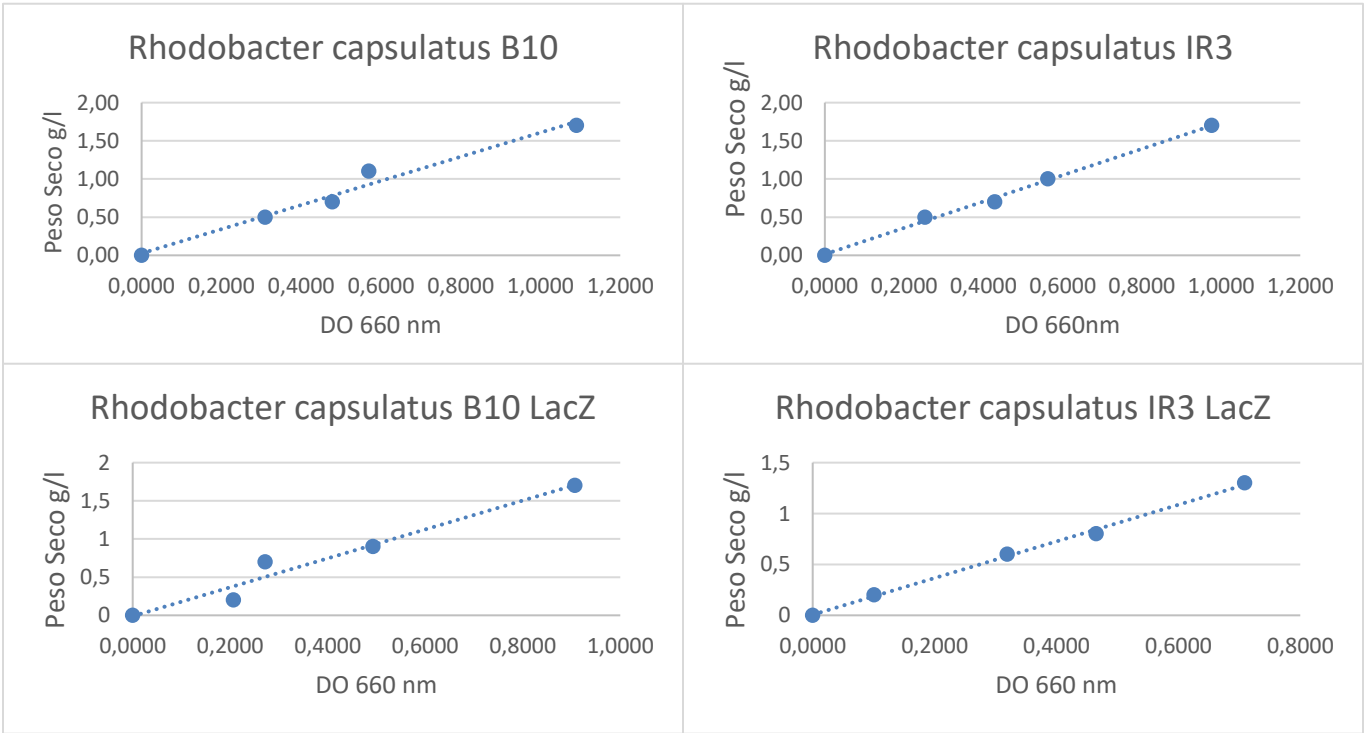


Tabla A2 Estadísticas Regresiones PS vs DO

	Rhodobacter capsulatus			
Estadísticas de la regresión	**B10**	**IR3**	**B10 LacZ**	**IR3 LacZ**
Coeficiente de correlación múltiple	0.988	0.998	0.981	0.999
Coeficiente de determinación R2	0.976	0.996	0.962	0.997
R2 ajustado	0.967	0.995	0.949	0.997
Error típico	0.116	0.044	0.151	0.030
Observaciones	5	5	5	5

B. Anexo: Protocolo HPLC

La medición de la concentración de azucares y ácidos orgánicos presentes en el medio antes y después de los experimentos se realiza utilizando cromatografía líquida de alta resolución HPLC, utilizando el detector de índice de refracción para cuantificar la cantidad de este carbohidrato presente en la muestra.

Se utilizó la columna Repromer RM9H0S2508, pre-columna RM9H0S0208 con las siguientes condiciones:

- Fase móvil = 0.01 M H_2SO_4
- Flujo = 0.4 ml/min
- Temperatura del horno = 30ºC
- Volumen de inyección = 20 µL
- Detector de índice de refracción (IR)

La preparación de las muestras siguió el siguiente protocolo:

- Se toma una muestra del reactor y se centrifuga a 13000 rpm.
- Se separa el sobrenadante y se almacena en el congelador.
- Del sobrenadante se realiza una dilución: para este caso se diluyó la muestra 1:10.
- Filtración: se pasó la muestra diluida por un filtro de 0.22 µm de tamaño de poro y se introduce en los viales.

Se realizaron las curvas de calibración para azucares y ácidos orgánicos obteniendo los siguientes valores:

Tabla B1 Calibración curvas HPLC

mg L^{-1}	Lactosa	Glucosa	Galactosa	
Tiempo de Retención (min)	13.4	15.2	16.2	
200	628579	531530	698517	
80	247127	196158	271251	
50	159421	127484	151913	
20	67609	55404	63231	
0	0	0	0	
mg L^{-1}	**Lactato**	**Formiato**	**Acetato**	**Butirato**
Tiempo de Retención (min)	20.5	22.5	24.2	34.3
400	1027004	209535	195894	636196
200	492253	107812	97934	322178
100	248657	52242	49961	165017
50	123063	26249	24486	96348
0	0	0	0	0

Con estos datos se obtuvieron las siguientes ecuaciones:

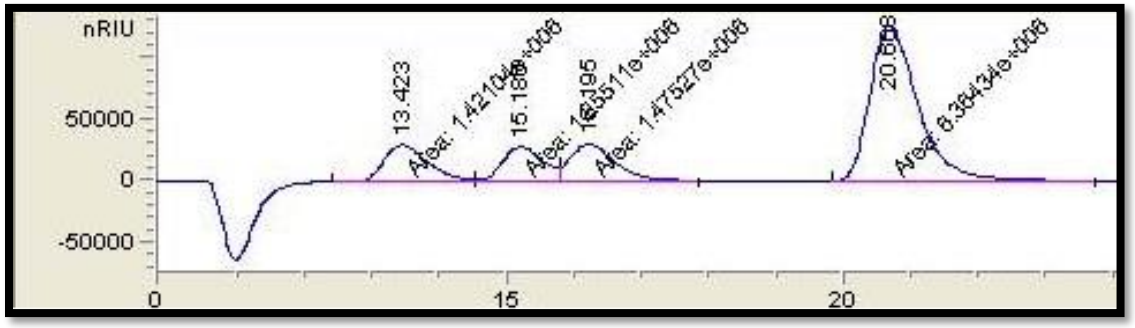
Tabla B2 Ecuaciones Calibración HPLC

[Lactosa]mg L^{-1}=	0.0003195	***Área**
[Galactosa]mg L^{-1}=	0.0002837	***Área**
[Glucosa]mg L^{-1}=	0.0003767	***Área**
[Lactato]mg L^{-1}=	0.0003895	***Área**
[Acetato]mg L^{-1}=	0.0019029	***Área**
[formiato]mg L^{-1}=	0.0020439	***Área**
[Butirato]mg L^{-1}=	0.0006354	***Área**

Tabla B3 Estadísticas Regresiones PS vs DO

Estadísticas de la regresión	Lactosa	Glucosa	Galactosa	Ac. Láctico	Ac. Fórmico	Ac. Acético	Ac. Butírico
Coef. de correlación múltiple	0.9999	0.9993	0.9995	0.9998	0.9999	0.999984	0.9997
Coef. de determinación R2	0.9998	0.9987	0.9989	0.9995	0.9997	0.999968	0.9994
R2 ajustado	0.9998	0.9983	0.9986	0.9994	0.9996	0.999958	0.9991
Error típico	1.1741	3.2790	2.9557	3.9275	2.9696	1.0293	4.6320
Observaciones	5.0000	5.0000	5.0000	5.0000	5.0000	5.0000	5.0000

Figura A1 Ejemplo Cromatograma HPLC



C. Anexo: Determinación de proteína

Para la determinación de proteínas solubles se utilizó el método de Folin and Lowry. Este es método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas. El método se divide en dos etapas.

En la realización de la curva de calibración se utilizó Albumina de suero bovino con una concentración de 400 µg/ml.

El procedimiento en este método es el siguiente:

1. Diluir la muestra de trabajo 50µl muestra 700µl de H_2O en un tubo Eppedorf de 2ml.
2. Agregar 500µl de reactivo de Lowry y agitar.
3. Dejar reposar la muestra 20 minutos en la oscuridad.
4. Adicionar 250 µl del reactivo de Folin y agitar.
5. Dejar reposar 30 minutos en la oscuridad.
6. Adicionar 1ml de muestra final en la celda y agitar.
7. Medir en el espectrofotómetro a 750nm.
8. Reportar la absorbancia de cada muestra.

A continuación, se presenta la curva de calibración realizada.

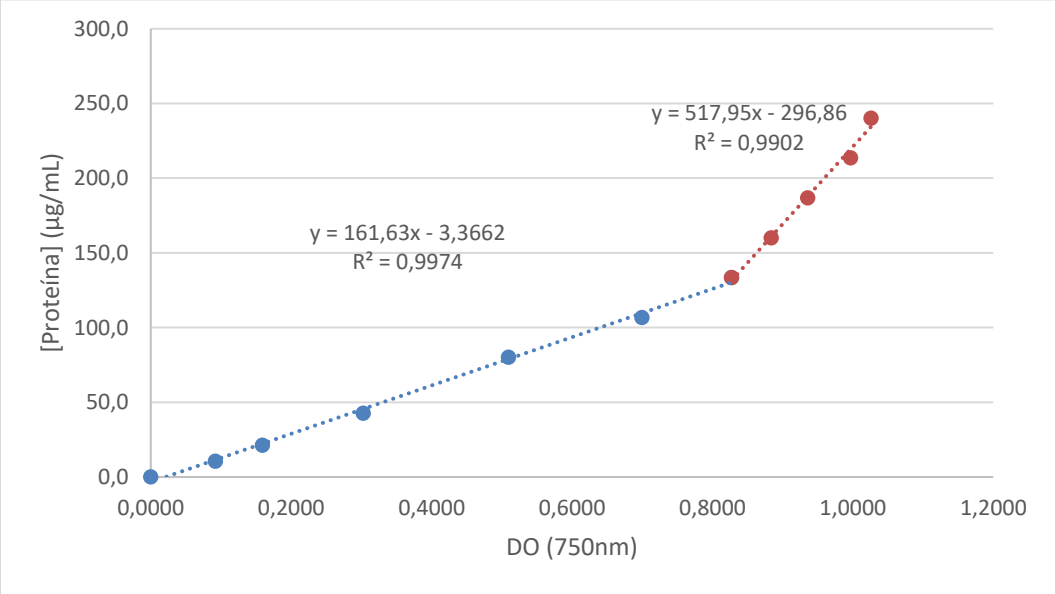
Tabla C1 Estadística de Regresión método de Lowry y Folin

Estadísticas de la regresión	**[Proteína]Alta**	**[Proteína]Baja**
Coeficiente de correlación múltiple	0.995	0.999
Coeficiente de determinación R2	0.990	0.997
R2 ajustado	0.987	0.997
Error típico	4.827	2.850
Observaciones	5	7

Tabla C2 Tabla calibración método Lowry y Folin

Curva de Calibración Lowry-Folin					
[Proteína] (µg/mL)	**µL BAS**	**µL H_2O**	**µL Lowry**	**µL Folin**	**DO 750 nm**
0.0	0	750	500	250	0.0000
10.7	20	730	500	250	0.0922
21.4	40	710	500	250	0.1591
42.7	80	670	500	250	0.3024
80.1	150	600	500	250	0.5093
106.8	200	550	500	250	0.6997
133.5	250	500	500	250	0.8273
160.2	300	450	500	250	0.8839
186.8	350	400	500	250	0.9356
213.5	400	350	500	250	0.9966
240.2	450	300	500	250	1.0261

Figura C1 Gráficas regresión lineal para curvas de calibración método Lowry y Folin



D. Anexo: Complemento Resultados Finales

SUERO INDUSTRIAL

Tabla D1 Resultados *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ – Fosfato

	Solución Fosfato					Sln Kolthoff
Corrida	**Tiempo inicio (h)**	**% conversión Lactato**	**Δ[Lactato] mM**	**% conversión Lactosa**	**% Rendimiento**	**Tiempo inicio (h)**
1	26	0.0	5.3	49.0	15	95
2	32	25.3	-5.6	24.4	12	95
3	26	0.0	1.5	97.6	6	85
4	26	30.8	-9.3	98.6	30	79
5	29	16.6	-6.0	42.1	20	23
6	32	0.0	4.7	28.4	10	95
7	26	13.3	-3.9	31.1	19	106
8	47	0.0	0.3	69.9	17	79
9	50	14.1	-2.7	63.2	16	71
10	45	35.9	-6.3	45.4	10	85
11	32	0.0	5.5	12.6	11	95
12	29	74.7	-13.0	49.6	10	82
13	26	0.0	8.9	6.2	12	79
14	26	0.0	6.8	14.2	6	79
15	26	0.0	6.4	21.1	8	23

SUERO SINTÉTICO

Tabla D2 Resultados *Rhodobacter capsulatus* B10::LacZ – Kolthoff

Corrida	Tiempo (h)	Tiempo de inicio (h)	% conversión Lactato	Δ[Lactato] mM	Productividad (ml L^{-1} h^{-1})
1	161	24	22.1	-2.8	3.73
2	164	24	18.3	5.1	6.54
3	212	96	65.3	5.0	5.40
4	146	17	25.3	-0.8	13.08
5	212	20	32.4	11.0	5.92
6	188	24	51.7	3.0	6.29
7	113	28	96.8	-8.3	16.41
8	117	24	55.6	-0.6	14.69
9	185	24	68.6	-4.5	6.09
10	185	17	80.2	1.2	6.49
11	185	17	64.4	-2.7	32.14
12	113	17	97.1	2.2	8.29
13	113	20	60.6	-1.0	17.38
14	212	17	98.1	-0.8	11.75
15	100	28	43.8	9.0	5.45
16	138	17	54.4	-5.6	14.62
17	113	17	73.6	-0.6	27.35
18	113	20	77.6	2.3	13.52
19	161	20	98.6	-10.9	10.95
20	113	17	50.7	0.0	18.83
21	113	28	68.4	0.2	14.64
22	212	17	96.5	-10.1	14.67
23	117	45	65.8	1.3	18.18
24	161	48	31.7	-1.7	4.01
25	209	38	97.0	1.4	11.96
26	100	24	98.5	1.1	15.64
27	233	96	80.4	-11.3	17.87
28	212	20	63.1	-0.5	19.55
29	212	17	85.4	-9.2	25.21
30	164	20	42.4	-2.5	9.48
31	269	59	97.6	-20.1	12.03
32	91	20	63.8	-0.7	21.38
33	113	20	44.0	2.6	10.06

Tabla D3 Resultados *Rhodobacter capsulatus* B10::LacZ – Fosfato

Corrida	Tiempo (h)	Tiempo de inicio (h)	% conversión Lactato	Δ[Lactato] mM	Productividad (ml L^{-1} h^{-1})
1	209	42	53.6	-8.3	4.87
2	212	48	16.2	-0.4	4.46
3	161	20	0.0	2.2	8.58
4	91	20	0.0	1.3	18.38
5	112	20	0.0	3.4	17.37
6	185	17	81.4	-7.3	14.84
7	91	42	31.9	-2.7	24.98
8	161	24	18.8	-1.6	17.67
9	212	24	97.6	-16.3	17.58
10	161	24	52.8	-6.1	15.36
11	185	17	19.2	-3.3	32.43
12	113	20	97.6	-4.9	13.84
13	113	48	5.2	-0.4	18.02
14	212	17	90.4	-8.8	20.75
15	161	42	0.0	3.1	4.86
16	161	42	21.3	-3.5	5.53
17	209	28	0.0	1.8	8.96
18	77	34	49.8	-5.3	10.15
19	48	20	83.0	-12.7	20.08
20	212	45	50.2	-4.2	11.15
21	113	28	4.4	-0.3	18.83
22	212	34	61.6	-9.4	5.23
23	71	20	0.0	5.5	13.83
24	140	42	44.0	-4.3	12.73
25	110	66	0.0	1.5	5.62
26	110	38	0.0	1.2	8.43
27	110	17	60.1	-10.4	19.83
28	212	20	66.3	-6.9	29.16
29	212	17	58.6	-10.4	25.04
30	110	20	68.6	-6.4	21.16
31	138	20	65.2	-10.3	10.67
32	117	28	24.3	-2.0	19.74
33	212	17	0.0	1.3	7.03
34	169	17	88.2	-16.1	17.00
35	152	17	91.2	-9.4	27.81
36	165	21	86.4	-8.4	16.97

Tabla D4 Resultados *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ – Kolthoff

Corrida	Tiempo (h)	Tiempo de inicio (h)	% conversión Lactato	Δ[Lactato] mM	Productividad (ml L^{-1} h^{-1})
1	378	48	0.0	7.6	28.43
2	330	68	36.4	-5.5	9.17
3	246	68	0.0	0.1	12.27
4	403	72	19.7	-3.3	5.64
5	270	48	0.0	8.2	35.93
6	330	26	40.8	-11.7	22.45
7	378	29	44.3	-13.4	17.63
8	354	29	20.5	-6.2	18.10
9	330	48	52.4	-22.4	23.72
10	274	29	36.3	-9.7	34.27
11	403	41	38.7	-16.9	9.38
12	222	26	0.0	4.1	16.38
13	246	52	0.0	2.7	41.54
14	306	26	44.2	-12.2	19.13
15	288	23	0.0	9.8	30.78
16	330	38	34.2	-13.7	27.80
17	378	23	19.5	-4.5	19.26
18	144	38	22.2	-4.8	30.43
19	403	23	43.9	-17.9	4.29
20	266	38	36.0	-9.5	27.99
21	330	34	10.8	-2.5	23.42
22	288	34	45.3	-19.6	4.89
23	270	48	0.0	4.4	7.14
24	216	52	21.1	-4.7	9.43
25	306	44	0.0	9.0	5.23
26	216	48	0.0	4.4	16.33
27	330	41	58.0	-25.7	10.94
28	354	29	37.6	-9.3	20.75
29	464	29	72.5	-36.1	9.09
30	288	68	43.3	-10.9	32.70
31	254	72	55.8	-23.4	18.68
32	246	38	59.2	-14.2	23.58
33	294	34	0.0	5.9	25.73

Tabla D5 Resultados *Rhodobacter capsulatus* B10::LacZ – Fosfato

Corrida	Tiempo (h)	Tiempo de inicio (h)	% conversión lactato	Δ[Lactato] mM	Productividad (ml L^{-1} h^{-1})
1	378	68	26.9	-10.9	24.15
2	259	48	0.0	3.4	15.83
3	158	48	0.0	7.9	6.90
4	306	48	38.1	-4.2	9.77
5	127	26	0.0	0.8	19.90
6	330	23	13.2	-3.5	23.80
7	378	29	45.2	-10.2	18.01
8	330	23	38.2	-10.1	21.43
9	161	13	0.0	7.6	24.96
10	266	23	33.2	-7.3	23.24
11	203	23	0.0	5.5	22.75
12	198	13	70.2	-8.5	15.84
13	330	23	37.7	-9.7	25.18
14	278	26	20.3	-5.7	18.57
15	198	26	0.0	5.8	13.82
16	250	29	80.4	-32.8	27.93
17	274	26	22.0	-5.5	17.98
18	270	23	14.5	-3.2	27.68
19	242	23	54.0	-22.8	19.53
20	302	23	34.2	-9.7	21.07
21	283	23	0.0	4.7	21.52
22	330	44	94.2	-46.1	12.45
23	378	26	2.1	-0.3	11.06
24	330	48	27.9	-7.0	22.09
25	222	48	0.0	0.3	9.91
26	294	29	0.0	4.1	14.47
27	298	48	49.0	-22.0	13.73
28	278	26	0.0	2.7	25.02
29	210	23	86.1	-42.0	31.17
30	330	29	27.0	-7.5	17.96
31	137	44	43.8	-18.6	27.34
32	283	23	55.6	-13.7	22.29
33	210	38	0.5	-0.1	22.60

Tabla D6 Diferencia de medias para tiempo total de producción de hidrógeno

	B10::LacZ		IR3::LacZ	
	Fosfato	***Kolthof***	***Fosfato***	***Kolthof***
Media	150.1	159.1	267.3	307.1
Varianza	2593.4	2266.0	4648.7	4565.7
Observaciones	33	33	33	33
Coeficiente de correlación de Pearson	0.250		0.073	
Diferencia hipotética de las medias	0		0	
Grados de libertad	32		32	
Estadístico t	-0.856		-2.475	
P(T<=t) Una cola	0.199		0.009	
Valor crítico de t (una cola)	1.694		1.694	
P(T<=t) dos colas	**0.398**		**0.019**	
Valor crítico de t (dos colas)	2.037		2.037	

E. Anexo: Análisis Anova Ecuaciones

SUERO SINTÉTICO

Tabla E1 Análisis Anova para *Rhodobacter capsulatus* B10::LacZ – Fosfato

	Suma de cuadrados	GL	Promedio de cuadrados	Valor-F	Valor-p
Modelo	67025562.7	13	5155812.5	20.5	< 0.0001
A-pH inicial	264880.7	1	264880.7	1.1	0.3162
B-[Lactosa]	1426996.2	1	1426996.2	5.7	0.0264
C-[Lactato]	7957031.3	1	7957031.3	31.6	< 0.0001
D-[Glutamato]	5742081.7	1	5742081.7	22.8	< 0.0001
E-Int. Lumínica	238455.9	1	238455.9	0.9	0.3411
AC	4139333.4	1	4139333.4	16.4	0.0005
AE	6807946.7	1	6807946.7	27.0	< 0.0001
BC	3216650.0	1	3216650.0	12.8	0.0017
BD	6520827.5	1	6520827.5	25.9	< 0.0001
CD	3052560.7	1	3052560.7	12.1	0.0021
C^2	9044913.3	1	9044913.3	35.9	< 0.0001
D^2	25001606.8	1	25001606.8	99.3	< 0.0001
E^2	4964384.8	1	4964384.8	19.7	0.0002
Residual	5539662.2	22	251802.8		
Falta de ajuste	3895701.2	13	299669.3	1.6	0.2308
Error puro	1643961.0	9	182662.3		
Total	72565225.0	35			

Tabla E2 Análisis Anova para *Rhodobacter capsulatus* B10::LacZ - Kolthoff

	Suma de cuadrados	GL	Promedio de cuadrados	Valor-F	Valor-p
Modelo	50128595.7	14	3580614.0	20.9	< 0.0001
A-pH inicial	1135767.1	1	1135767.1	6.6	0.0191
B-[Lactosa]	10159120.6	1	10159120.6	59.2	< 0.0001
C-[Lactato]	11152108.8	1	11152108.8	65.0	< 0.0001
D-Glutamato	1684780.2	1	1684780.2	9.8	0.0057
E-Int. Lumínica	209771.2	1	209771.2	1.2	0.2833
AD	2252418.0	1	2252418.0	13.1	0.0019
BC	5426109.9	1	5426109.9	31.6	< 0.0001
BE	1991712.6	1	1991712.6	11.6	0.0031
CD	2174007.5	1	2174007.5	12.7	0.0022
DE	3006253.3	1	3006253.3	17.5	0.0006
B^2	1186607.4	1	1186607.4	6.9	0.0170
C^2	843839.3	1	843839.3	4.9	0.0396
D^2	5590477.8	1	5590477.8	32.6	< 0.0001
E^2	1522063.0	1	1522063.0	8.9	0.0080
Residual	3087217.0	18	171512.1		
Falta de ajuste	2306414.1	12	192201.2	1.5	0.3287
Error puro	780802.8	6	130133.8		
Total	53215812.7	32			

Tabla E3 Análisis Anova para *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ - Fosfato

	Suma de cuadrados	GL	Promedio de cuadrados	Valor-F	Valor-p
Modelo	5964.60	11	542.24	23.21	< 0.0001
A-pH inicial	0.26	1	0.26	0.01	0.9176
B-[Lactosa]	288.43	1	288.43	12.35	0.0021
C-[Lactato]	1462.13	1	1462.13	62.58	< 0.0001
D-Glutamato	148.05	1	148.05	6.34	0.0200
E-Int. Lumínica	27.90	1	27.90	1.19	0.2869
AC	620.35	1	620.35	26.55	< 0.0001
BE	402.14	1	402.14	17.21	0.0005
CD	238.21	1	238.21	10.20	0.0044
CE	180.11	1	180.11	7.71	0.0113
A^2	170.08	1	170.08	7.28	0.0135
C^2	502.59	1	502.59	21.51	0.0001
Residual	490.63	21	23.36		
Falta de ajuste	404.63	15	26.98	1.88	0.2237
Error puro	86.00	6	14.33		
Total	6455.23	32			

Tabla E4 Análisis Anova para *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ - Kolthoff

	Suma de cuadrados	GL	Promedio de cuadrados	Valor-F	Valor-p
Modelo	12042.43	12	1003.54	21.4	< 0.0001
A-pH inicial	26.37	1	26.37	0.6	0.4622
B-[Lactosa]	1059.27	1	1059.27	22.6	0.0001
C-[Lactato]	261.07	1	261.07	5.6	0.0286
D-Glutamato	646.74	1	646.74	13.8	0.0014
E-Int. Lumínica	49.42	1	49.42	1.1	0.3170
AC	555.96	1	555.96	11.8	0.0026
AD	1832.21	1	1832.21	39.0	< 0.0001
BD	237.11	1	237.11	5.1	0.0360
BE	393.78	1	393.78	8.4	0.0089
CE	902.19	1	902.19	19.2	0.0003
C^2	176.36	1	176.36	3.8	0.0668
E^2	3643.34	1	3643.34	77.6	< 0.0001
Residual	938.45	20	46.92		
Falta de ajuste	671.45	14	47.96	1.1	0.4953
Error puro	266.99	6	44.50		
Total	12980.88	32			

SUERO INDUSTRIAL

Tabla E5 Análisis Anova para *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ – Fosfato

	Suma de cuadrados	GL	Promedio de cuadrados	Valor-F	Valor-p
Modelo	62786978.0	5	12557395.6	47.4	< 0.0001
A-% Suero (v/v)	19446115.7	1	19446115.7	73.4	< 0.0001
B-Molibdeno	9603650.1	1	9603650.1	36.2	0.0002
C-Luz	4506666.7	1	4506666.7	17.0	0.0026
BC	2008264.5	1	2008264.5	7.6	0.0224
A^2	14928396.7	1	14928396.7	56.3	< 0.0001
Residual	2385000.0	9	265000.0		
Falta de ajuste	777727.3	5	155545.5	0.4	0.8370
Error puro	1607272.7	4	401818.2		
Total	65171978.0	14			

F. Anexo: Gráficos Residuales

SUERO SINTÉTICO

Figura F1 Gráficos Residuales Modelo *Rhodobacter capsulatus* B10::LacZ - Fosfato

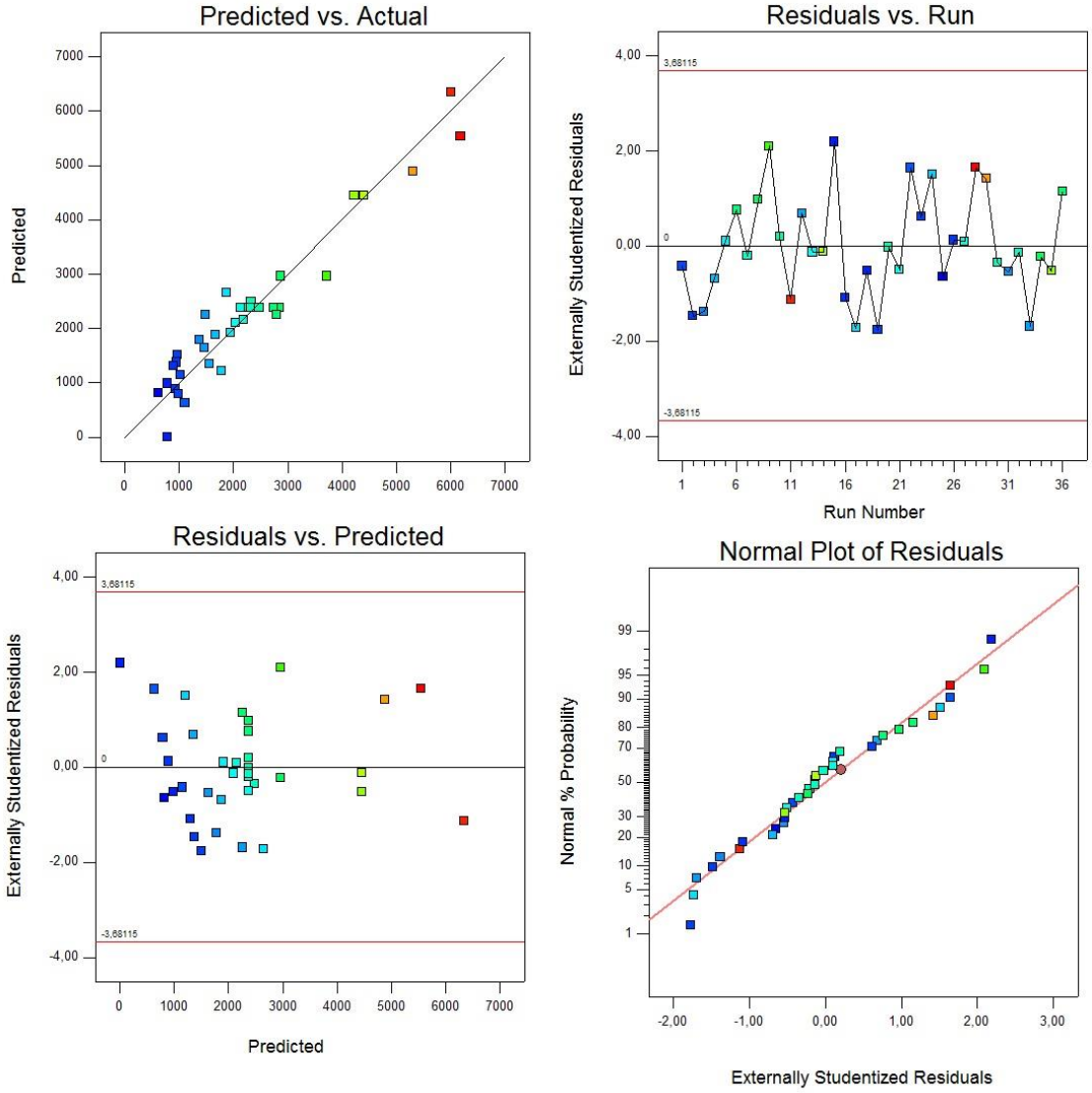


Figura F2 Gráficos Residuales Modelo *Rhodobacter capsulatus* B10::LacZ - Kolthoff

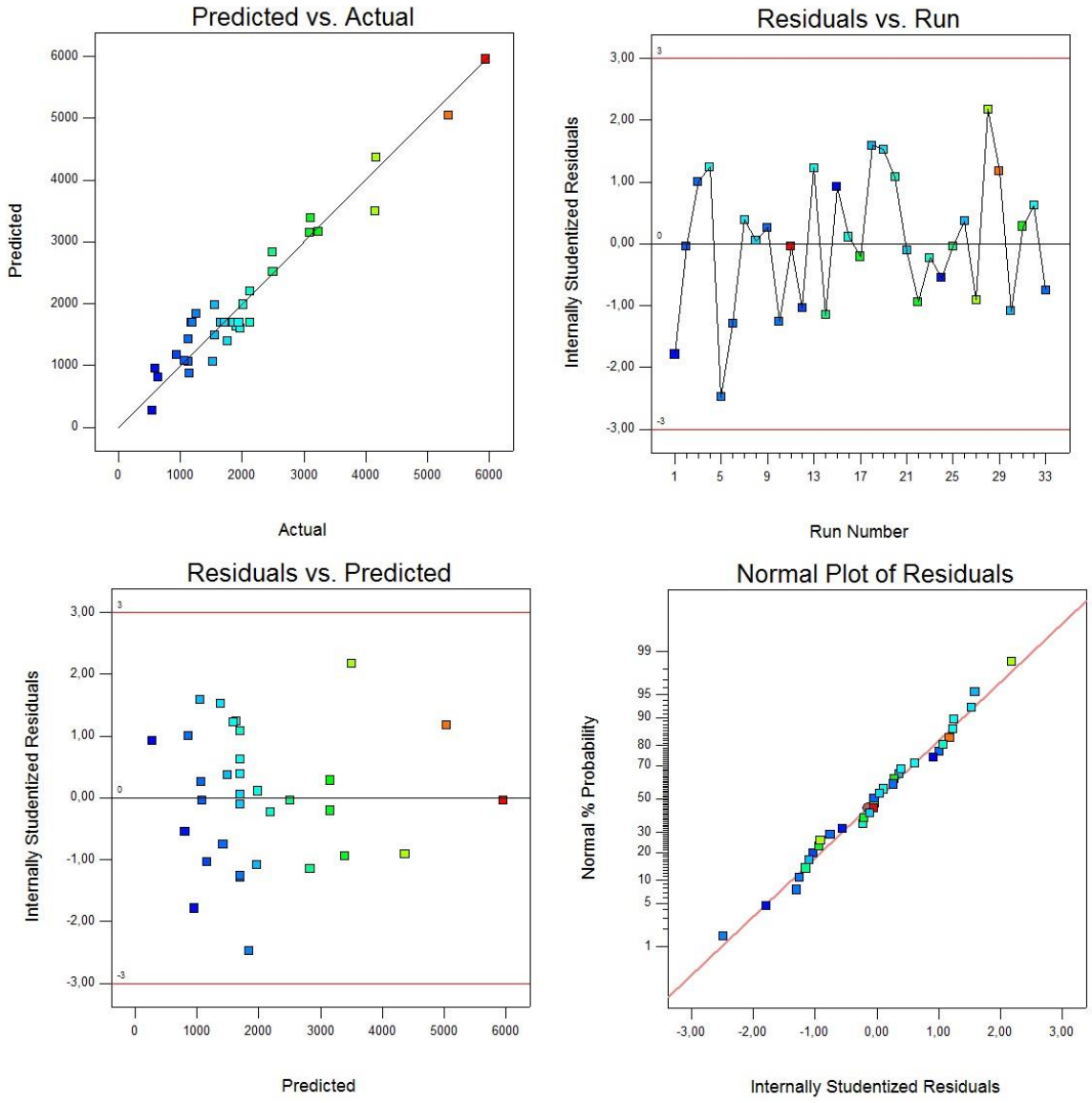


Figura F3 Gráficos Residuales Modelo *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ - Fosfato

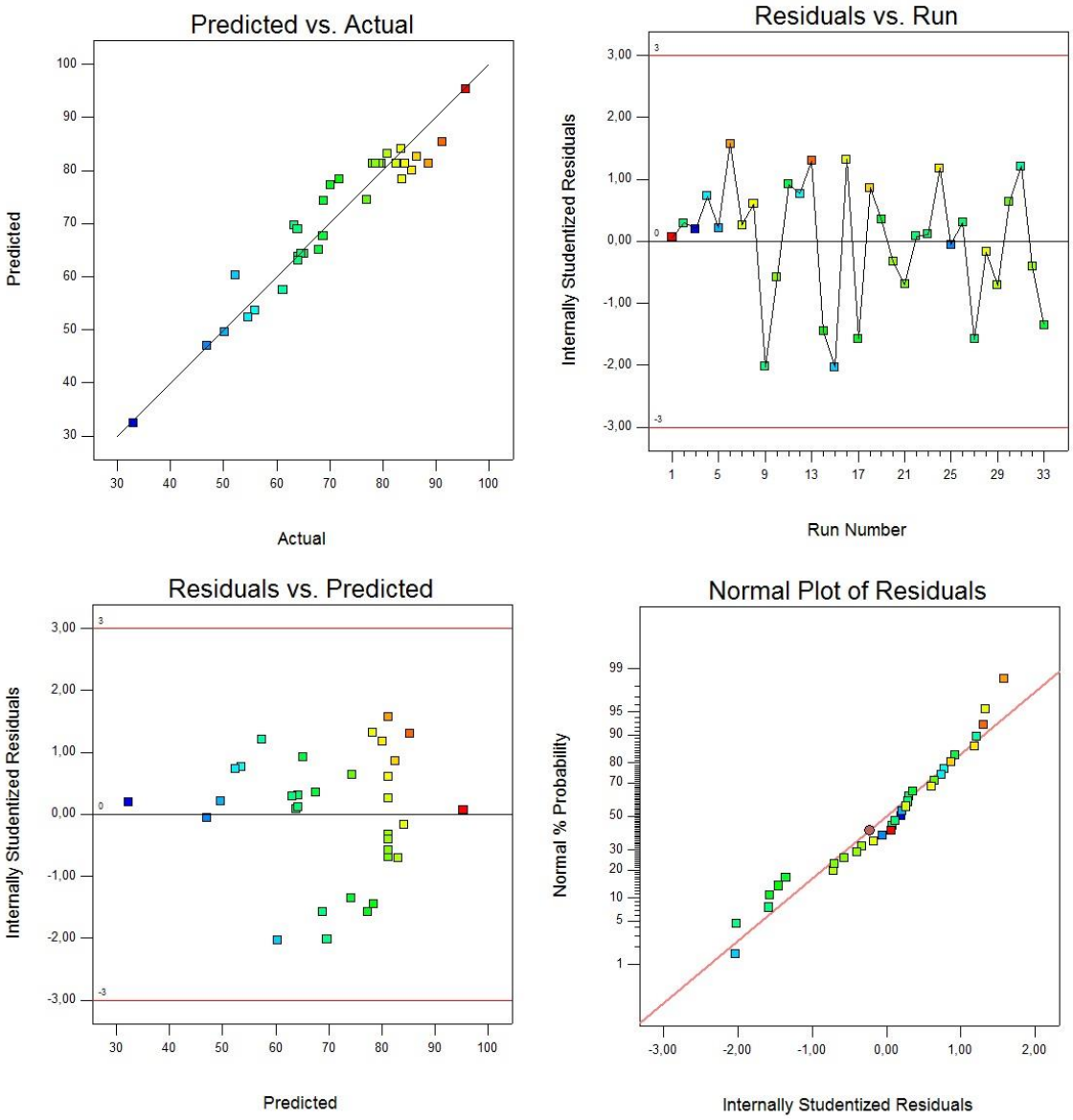
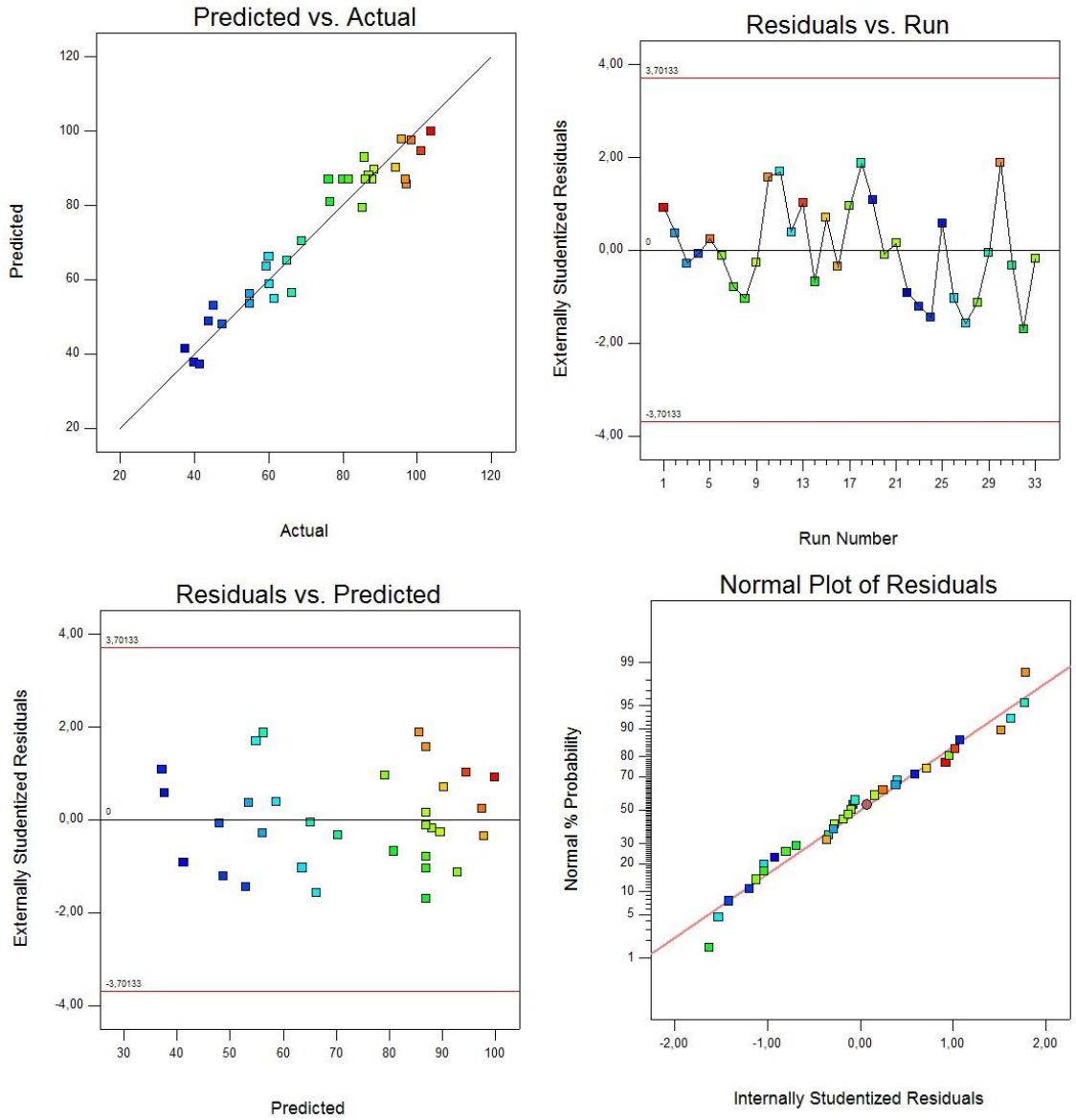
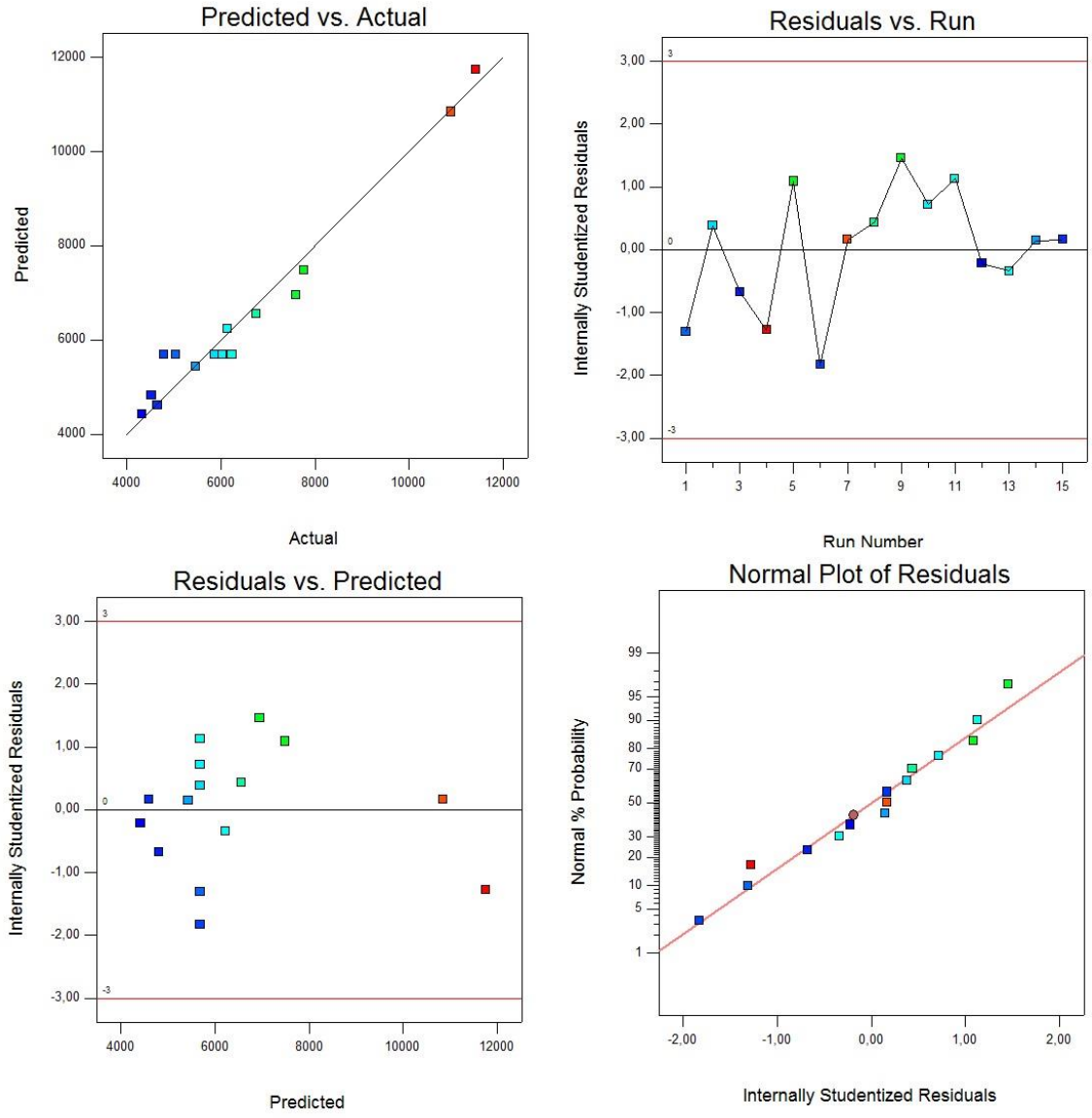


Figura F4 Gráficos Residuales Modelo *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ - Kolthoff



SUERO INDUSTRIAL

Figura F5 Gráficos Residuales Modelo *Rhodobacter capsulatus* IR3::LacZ - Fosfato



G. Anexo: Desproteinización

Los intervalos de estudio seleccionados se observan en la tabla G1.

Tabla G1 Condiciones diseño de experimentos Desproteinización

Tipo de Estudio	Superficie de Respuesta
Tipo de Diseño	Central Compuesto
Temperatura °C	60 -100
pH	4.0 - 7.0
Respuestas	% de desproteinización

Mediante el uso de la herramienta estadística *Design Expert* se generó una matriz de 13 experimentos que se muestra en la Tabla G2 así como los resultados para cada experimento. El método de determinación de proteínas en el suero fue Lowry y Folin (Ver **Anexo C)**. La concentración inicial de proteínas en el suero fue de 11g L^{-1}. El tiempo total de cada experimento fue de 60 minutos.

Tabla G2 Matriz de experimentos y resultados Desproteinización

Diseño			
Corrida	**T (°C)**	**pH**	**Desproteinización (%)**
1	60.00	7.00	63.7
2	100.00	4.00	71.7
3	100.00	7.00	67.8
4	80.00	5.50	66.4
5	80.00	7.00	64.9
6	80.00	5.50	67.2
7	80.00	4.00	68.9
8	60.00	4.00	67.1
9	80.00	5.50	65.9
10	100.00	5.50	70.0
11	80.00	5.50	66.76
12	80.00	5.50	67.4
13	60.00	5.50	66.4

Para comprobar cómo afecta la desproteinización del suero su composición, especialmente de lactosa y lactato se midió su concentración en el suero mediante HPLC (ver **Anexo B**) y sus valores iniciales fueron 0.20M para la lactosa y 40mM para el lactato. Estas concentraciones no se vieron modificadas por la metodología de desproteinización para ningún experimento.

Los resultados de los experimentos permitieron obtener un modelo matemático con el cual se pudo determinar los valores de pH y temperatura entre los intervalos estudiados para tener una mejor desproteinización. El modelo matemático se muestra A continuación en la Ecuación G1 y su Anova se encuentra en la tabla G3.

Ecuación G1 Modelo de Desproteinización

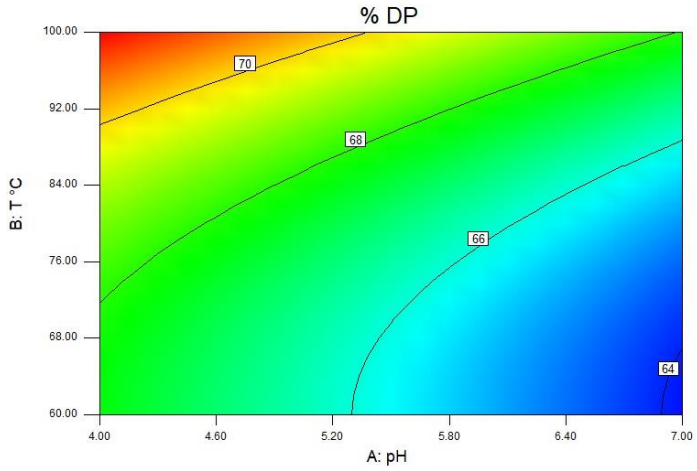
% Desproteinización	=
81.4903	
-1.2551	* pH
-0.2973	* T
0.0025	* T^2

Tabla G3 Análisis Anova Modelo desproteinización

Modelo (valor p)	< 0.0001
Falta de ajuste (valor p)	0.80
C.V. %	0.75
R^2	0.96
R^2 Ajustado	0.94
R^2 Previsto	0.92

Según el análisis Anova este modelo describe correctamente el espacio de estudio. El valor R^2 para el modelo es bueno pues cuanto más cerca de 1 mejor ajusta el modelo. El R^2 ajustado 0.94 es aceptable ya que es muy superior al límite mínimo 0,85. El CV % indica que el modelo tiene una precisión buena ya que es menor a 10%.

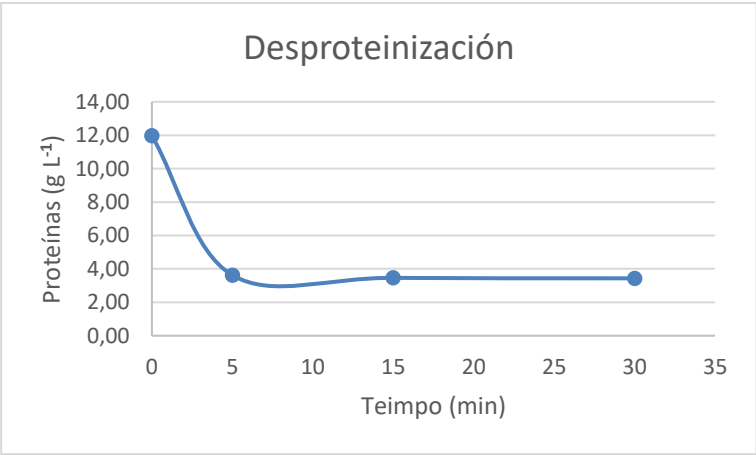
Figura G1 Contorno Modelo de Desproteinización



En la Figura G1 se observa el gráfico de contorno que se genera con el modelo expresado en la Ecuación G1, las zonas rojas son en las que se lleva a cabo una mayor desproteinización, las zonas azules en cambio son en las que menos desproteinización se obtuvo. En la figura se observa que los mejores porcentajes de desproteinización se dan a temperatura de 100°C y pH de 4.0 obteniendo un porcentaje de desproteinización alrededor de 70%, con un contenido final de proteína de 3.6 g L^{-1}.

A estas condiciones se realizó un experimento para determinar el tiempo requerido para obtener el máximo porcentaje de desproteinización, los resultados se observan en la figura G2.

Figura G2 Desproteinización en el tiempo



Como se puede observar no existe una variación significativa en la concentración de proteínas a partir de 5 minutos.