

Producción de hidrógeno por fermentación oscura a partir de residuos vegetales y cascarón de huevo como amortiguador de pH

Virginia Montiel Corona^{a*}, Marcia Morales Ibarria^b, Sergio Revah Moiseev^b, José Antonio Guevara García^c

^a Doctorado en Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340, México D.F., MEXICO.

^b Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Avenida Vasco de Quiroga 4871, colonia Santa Fe, Delegación Cuajimalpa de Morelos, C.P. 05348 México, D.F.

^c Laboratorio de Investigación en Bioinorgánica y Biotecnología (LIByB). Fac. de Ciencias Básicas, Ingeniería y Tecnología. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Campus Apizaco, P.O. Box 140, 90300. Apizaco, Tlaxcala. México.

*E-mail: zeltzin24.vm@gmail.com

Recibido 26 de febrero 2015, Aceptado 8 de mayo 2015

Resumen

La fermentación oscura es uno de los métodos biológicos más prometedores para la producción de hidrógeno a gran escala. Sin embargo para que su aplicación sea viable se requiere el desarrollo de condiciones de operación más prácticas y económicas que las actuales. Por ello en este trabajo se llevó a cabo la producción de hidrógeno utilizando residuos vegetales como sustrato, un inóculo anaerobio proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales, cascarón de huevo (CH) como amortiguador de pH y vacío en lugar del gas nitrógeno para establecer condiciones anaerobias y retirar el hidrógeno producido de los reactores. Se probaron dos diluciones del sustrato (1:1 y 1:2), cuatro concentraciones de CH (0, 1, 2 y 4%), dos tratamientos térmicos para el inóculo (microondas y baño maría) y la suplementación de nutrientes inorgánicos.

El tratamiento térmico del inóculo por microondas fue eficiente y rápido para eliminar a las arqueas productoras de metano en comparación con el de baño maría. La adición de CH tuvo un efecto significativamente positivo sobre la producción de hidrógeno debido a su buen desempeño como amortiguador de pH. Los mejores resultados se obtuvieron con el uso de cascarón de huevo al 2% y dilución del sustrato 1:2, produciendo 8.3 L H₂/Kg de residuo y con una remoción de sólidos volátiles totales (SVT) del 37%. Adicionalmente se observó que la suplementación del sustrato con nutrientes no mejoró la producción de H₂ y que la utilización de vacío en lugar de N₂ es factible. Las condiciones para producir H₂ que se encontraron en este trabajo pueden contribuir a la producción económica y ambientalmente amigable de hidrógeno por fermentación oscura.

Palabras clave: Biohidrógeno, residuos, cascarón de huevo, microondas.

1. Introducción

Los efectos negativos de la utilización de los combustibles fósiles como fuentes principales de energía se han observado en todos los niveles sociales. La disminución de las reservas debido al aumento de la demanda de energía por el crecimiento poblacional y economías emergentes ha provocado un aumento de los precios e inseguridad política en las regiones productoras [1,2]. Aunado a esto también nos enfrentamos a los problemas de contaminación ambiental, en el periodo 1971-2010, la emisión mundial de CO₂ derivada del consumo de combustibles fósiles aumentó alrededor de 115% [3].

El hidrógeno es la más prometedora de las fuente alternas de energía por ser un buen vector energético y porque durante su utilización no se emite CO₂ [4], su producción por métodos biológicos y a partir de residuos puede contribuir considerablemente a reducir las emisiones de CO₂ y ayudar al tratamiento de los residuos orgánicos municipales que se producen en grandes

cantidades en nuestro país y que representan un problema ambiental al no ser tratados correctamente.

El proceso de acidogénesis en la digestión anaerobia para producir hidrógeno conocido como fermentación oscura tiene potencial económico para la producción de H₂ a partir de residuos orgánicos [5] debido a la rapidez y a los bajos requerimientos operacionales [6]. En este proceso un factor clave es el pH, pues de este depende que se lleve a cabo la producción de hidrógeno en la fase de acidogénesis (pH 5.5-7) o la producción de solventes en detrimento de la de hidrógeno (pH por abajo de 4.5) [5].

En la literatura predominan trabajos llevados a cabo bajo condiciones controladas de laboratorio con ajuste inicial y control automático del pH o con la utilización de amortiguadores químicos, con suplementación de micronutrientes inorgánicos, cultivos puros y, por ende, condiciones estériles o consorcios tratados térmicamente por ebullición o químicamente para la selección de las bacterias productoras de hidrógeno, sustratos modelo como la glucosa, purgado con nitrógeno para propiciar

condiciones anaerobias y baja presión parcial de hidrógeno que resultan poco prácticas.

Es por ello que el objetivo de este trabajo fue explorar condiciones más prácticas para la producción de H_2 como el uso de residuos vegetales como sustrato, un consorcio anaerobio tratado térmicamente por microondas y baño maría, sin el ajuste y control de pH, con la utilización de un residuo (cascarón de huevo) como buffer, sin suplementos inorgánicos y purgado con vacío.

2. Parte experimental

Como inóculo se empleó un lodo proveniente del digestor metanogénico de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Como sustrato se empleó una mezcla molida de verduras y cáscaras de frutas provenientes de residuos de cocina, la concentración de sólidos totales de la mezcla fue de 67 gST/kg de residuo y 62 gSVT/kg de residuo. Para la selección de los microorganismos productores de hidrógeno el inóculo fue tratado térmicamente, se probaron dos métodos: baño maría a 90°C por 30 minutos, de acuerdo a Lee *et al.* [7] y microondas por 1.5 minutos, en intervalos de 30 s. Se realizó un ensayo preliminar para seleccionar el mejor tratamiento térmico con una dilución 1:1 del sustrato y 1% de CH. Posteriormente se planteó un diseño de experimentos factorial para la selección de la dilución de sustrato (dilución 1:1 y 1:2) y concentración de harina de CH (0%, 1%, 2% y 4%), este porcentaje fue adicionado en función del peso de residuos colocado en cada dilución. Finalmente y con el mejor tratamiento del experimento anterior se probó la suplementación de nutrientes: $(NH_4)_2PO_4$ 3.0 g/L, KH_2PO_4 0.6 g/L, K_2HPO_4 2.4 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g/L, $CaSO_4$ 0.15 g/L y $FeSO_4$ 0.03 g/L. Todos los tratamientos se llevaron a cabo en viales de 120 mL con un volumen de trabajo de 50 mL, 10% de inóculo, sin el ajuste inicial de pH, incubación a 35 °C; mediante vacío se propició condiciones anaerobias, y se retiró el biogás producido de manera intermitente.

La composición de biogás se determinó utilizando un cromatógrafo de gases (Gow Mac 550) con detector TCD y columna de silica-gel (Alltech) 18' x 1/8' x 0.085". La temperatura de la columna fue de 30°C, la del inyector y detector fueron de 75°C y 120°C respectivamente. El nitrógeno fue utilizado como acarreador a un flujo de 30 mL/min. El volumen de hidrógeno fue ajustado a 273 °K y 1 atm. La concentración de ácidos grasos volátiles (AGVs) en los extractos acidogénicos se determinó en un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 Serie II con detector FID y columna capilar AT1000 de 30-m. Las temperaturas del inyector y detector fueron de 200 °C, la temperatura del horno fue sostenida por 2 min a 80 °C, incrementando a 200 °C a 15 °C/min, y después constante a 200 °C por 1 min. Como gas de arrastre, nitrógeno a un flujo de 70 mL/min. La determinación de sólidos volátiles totales (SVT) se hizo por métodos estándar.

3. Resultados y discusión

3.1. Tratamiento térmico

El inóculo proveniente del digestor metanogénico presentó capacidad para la producción de H_2 a partir de los residuos vegetales. Los resultados de los ensayos preliminares para seleccionar el mejor tratamiento térmico mostraron que los tratamientos a los que se les colocó inóculo tratado en baño maría produjeron una mezcla de hidrógeno y metano, por lo que el calentamiento a 90 °C por 30 minutos no fue suficiente para suprimir a las arqueas metanogénicas presentes en este inóculo. El calentamiento con microondas resultó eficiente y rápido, inhibió la actividad de los metanógenos y enriqueció al inóculo de bacterias formadoras de esporas las cuales pueden ser del género *Clostridium*. A diferencia de Faloye *et al.* [8] quienes aplicaron un método híbrido microondas por 2 min y alcalinizaron con NaOH hasta pH 11, en nuestro trabajo el tratamiento sólo con microondas fue suficiente y simple.

3.2. Cascarón de huevo como amortiguador de pH.

En muchos de los trabajos reportados en la literatura se emplean fosfatos o carbonatos grado reactivo para preparar amortiguadores y evitar grandes variaciones de pH durante la fermentación oscura, sin embargo esto encarece el proceso. El cascarón de huevo se compone principalmente de $CaCO_3$ (94%) [9], por lo que en este trabajo y a partir de un trabajo previo [10] se probó como amortiguador de pH con la finalidad de reducir los costos. En la figura 1 se presenta la producción acumulada de H_2 por los tratamientos del experimento para seleccionar la dilución del sustrato y concentración de CH.

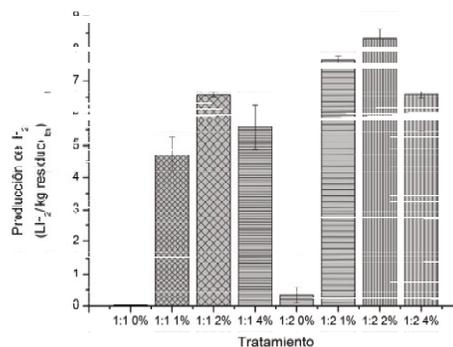


Figura 1. Producción acumulada de hidrógeno para cada tratamiento.

La adición de CH favoreció significativamente la producción de hidrógeno; en la figura 1 se puede ver que sólo en los tratamientos con CH hubo producción de hidrógeno. En estos tratamientos el pH se mantuvo alrededor de 5.5, un pH óptimo para la fermentación hidrogenogénica y en los tratamientos sin CH el pH final fue de 4.3, esto indica que el CH se desempeñó como un buen amortiguador del pH en la fermentación y aunque el $CaCO_3$ es muy poco soluble en agua, a medida que se fueron produciendo los AGVs se fue disolviendo y de esta

manera se liberó el ión carbonato que actúa como amortiguador de pH. Los pH finales siempre fueron ácidos debido a la conversión de los carbohidratos contenidos en los residuos vegetales en ácidos orgánicos volátiles, proceso conocido como acidogénesis donde simultáneamente se produce H₂ y ácidos.

En los tratamientos sin CH la producción de H₂ fue nula o muy baja; el pH para estos tratamientos bajo de 6.8 a 4.3, el cual es muy bajo para permitir la actividad productora de H₂, valores de pH bajos resultan en la inhibición de la enzima hidrogenasa, a ese pH la ruta metabólica de acidogénesis se detiene y comienza la producción de solventes, durante la solventogénesis pueden producirse metanol, etanol, cetonas y CO₂ [11] dando como resultado una mezcla de AGVs y solventes.

La concentración óptima de CH para la producción de hidrógeno fue del 2% para ambas diluciones, una concentración de 1% de CH fue insuficiente y 4% pudo aumentar la concentración de sales a un nivel que aunque no inhibió la producción de hidrógeno empezó a afectar el metabolismo productor de hidrógeno de los microorganismos presentes. El tratamiento dilución 1:2 (lo cual equivale a 22 g de SVT alimentados/L) con 2% de CH presentó la producción más alta, 8.3 L H₂/kg de residuo en base húmeda, esto equivale a 125 mL H₂/g ST alimentados ó 134 mL H₂/g SVT o bien 986 mL H₂/g SVT removidos. Estos rendimientos superan en gran medida los obtenidos por Ramos *et al.* [12] quienes reportan una producción de H₂ de 10 mL H₂/g ST alimentados cuando emplean una concentración de sustrato (residuos de cafetería) de 10 g ST/L o bien 0.4 mL H₂/g ST con una concentración de 40 g ST/L. Gómez *et al.* [13] reporta producciones de 27-28 mL/g SV alimentados, Kim *et al.* [14] 137 mL/g SV alimentados and Zhu *et al.* [15] 112 mL H₂/g SV alimentado.

En la Tabla 1 se presenta la concentración de AGVs al final de la fermentación, el ácido butírico se produce en mayor proporción, posteriormente el ácido acético y pequeñas cantidades de propiónico, lo cual indica que en el inóculo puede estar presente *Clostridium butyricum* debido a que la producción de ácido acético y butírico generalmente está asociada a su metabolismo productor de hidrógeno [16].

Tabla 1. Concentración de ácidos grasos volátiles al final de la fermentación oscura.

Tratamiento		Ácido acético (g/L)	Ácido propiónico (g/L)	Ácido butírico (g/L)
Dilución	CH			
1:1	0.0%	2.3	0.8	0.8
1:1	1%	1.2	0.3	6.8
1:1	2%	2.8	0.6	7.0
1:1	4%	4.3	0.4	6.4
1:2	0%	1.7	0.1	0.1
1:2	1%	2.3	0.5	4.5
1:2	2%	2.6	0.5	4.2
1:2	4%	3.8	0.5	3.8

Con respecto a la concentración de sustrato, en la Figura 1 se puede observar que hay mayor producción de H₂ en los experimentos donde el sustrato se diluyó 2 veces (la concentración máxima de hidrógeno en el biogás fue del 50% y la fermentación se mantuvo por 72 horas). Una alta concentración de sustrato puede inhibir a las bacterias productoras de hidrógeno debido a que al haber más carbohidratos la producción de AGVs se acelera e incrementa a niveles que son inhibitorios para las bacterias. Esto se puede observar en la Tabla 1 en donde los tratamientos con dilución 1:1 alcanzaron concentraciones de ácido butírico de 7 g/L y en los de dilución 1:2 solo 4.2 g/L. Para evitar este efecto inhibitorio sobre las bacterias se podría diluir más el sustrato, sin embargo no es deseable usar altas diluciones por los requerimientos de agua.

La remoción de sólidos volátiles en los tratamientos con CH fue alrededor del 37% (ver figura 2). Aunque la producción de H₂ en los tratamientos con dilución 1:1 no excede las de dilución 1:2 presenta las mismas remociones de sólidos y esto se explica porque se produjeron más ácidos grasos volátiles (ver tabla 1).

En los tratamientos sin CH no hubo producción de hidrógeno, sin embargo presentaron remoción de sólidos por la producción de CO₂, AGVs y solventes.

3.3. Suplementación con nutrientes.

En trabajos como el de Ramos *et al.* [12], Zhu *et al.* [15] y Lee *et al.* [17] (por mencionar algunos), suplementaron con nutrientes químicos a los residuos de comida que emplearon como sustrato para la producción de hidrógeno, sin embargo no reportan algún tratamiento sin la suplementación de nutrientes, es por ello que con la finalidad de determinar si es necesario suplementar estos residuos con nutrientes para aumentar la producción de hidrógeno se prepararon dos tratamientos: dilución 1:2 con 2% de CH con la adición de nutrientes y otro sin la adición de nutrientes mencionados en la parte experimental. Los resultados arrojaron que la adición de nutrientes no mejora la producción de hidrógeno, al parecer los residuos de frutas y verduras que se emplearon cuentan con los nutrientes necesarios para las bacterias productoras de hidrógeno y el cascarón de huevo aportó la alcalinidad necesaria para el proceso. Este hecho es una buena noticia pues al no requerir el consumo de reactivos químicos los costos de producción disminuyen.

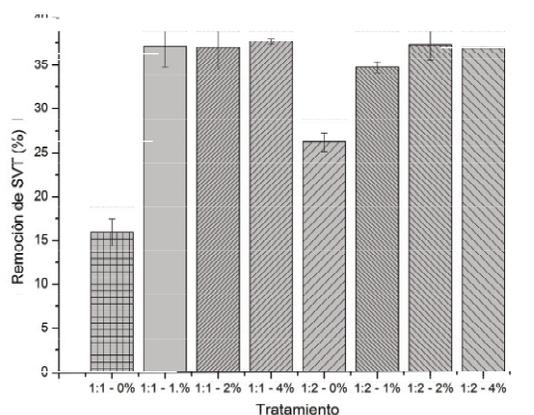


Figura 2. Remoción de sólidos volátiles totales en cada tratamiento.

3.4. Purgado con vacío

En todos los tratamientos se usó vacío para propiciar condiciones anaerobias y retirar el hidrógeno producido en lugar de purgar con nitrógeno como comúnmente se hace, el utilizar nitrógeno encarece el proceso primero por el gasto que implica adquirirlo y segundo porque dificulta la purificación del hidrógeno.

Otra ventaja de emplear vacío y mantener la presión del reactor por debajo de la presión atmosférica es que se puede tener un efecto positivo en los rendimientos de producción de hidrógeno, Becker *et al.* [17] observaron un aumento en los rendimientos del 7% al mantener la presión del reactor por debajo de la presión atmosférica.

4. Conclusiones

En este trabajo se encontraron condiciones más prácticas y económicas para la producción de H₂ por fermentación oscura. Se encontró que se pueden obtener buenos rendimientos de H₂ utilizando residuos vegetales como sustrato sin la utilización de sustancias químicas para regular el pH y sin la adición de nutrientes. El cascarón de huevo funcionó bien como amortiguador de pH. Además la utilización de microondas para la selección de bacterias productoras de H₂ fue eficaz y la utilización de vacío en lugar de nitrógeno facilita la purificación del H₂ producido.

5. Referencias

- Kothari, R.; Tyagi, V.V.; Pathak, A. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2010**, 14, 3164–3170.
- Bleischwitz, R.; Bader, N. *Energ. Policy.* **2010**, 38, 5297–5300.
- SEMARNAT. <http://www.semarnat.gob.mx> (accesado el 7 de julio de 2014).
- Kapdan, I.K.; Kargi, F. *Enzyme Microb Technol.* **2006**, 38, 569–582.
- Gadhamshetty, V.; Johnson, D.C.; Nirmalakhandan, N.; Smith G.B.; Deng S. *Int. J. Hydrogen Energy.* **2009**, 34, 1233–1243.
- Chang, P.L.; Hsu, C.W. *Int. J. Hydrogen Energy.* **2012**, 37, 15746–15752.

- Lee, D.Y.; Ebie, Y.; Xu, K.Q.; Li, Y.Y.; Inamori, Y. *Bioresource Technol.* **2010**, 101, S42–S47.
- Faloye, F.D.; Gueguim Kana, E.B.; Schmidt, S. *Int. J. Hydrogen Energy.* **2014**, 1–10.
- Stadelman, W.J. *Encyclopedia of food science and technology.* John Wiley & Sons, New York: **2000**; pp. 593–599.
- Montiel Corona, V.; Sánchez Camarillo, A.R.; Guevara García J.A. *Ciencia, Tecnología e Innovación para el Desarrollo de México, PCTI.* **2010**, 66. Sitio de internet: <http://pcti.mx>.
- De Giannis, G.; Muntoni, A.; Poletini, A.; Pomi, R. *Waste Manage.* **2013**, 33, 1345–1361.
- Ramos, C.; Buitrón, G.; Moreno-Andrade, I.; Chamy, R. *Int. J. Hydrogen Energy.* **2012**, 37, 13288–13295.
- Gómez, X.; Cuertos, M.J.; Prieto, J.I.; Morán, A. *Renew. Energy.* **2009**, 34, 970–975.
- Kim, D.H.; Wu, J.; Jeong, K.-W.; Kim, M.S.; Shin, H.S. *Int. J. Hydrogen Energy.* **2011**, 36, 10666–10673.
- Zhu, H.; Parker, W.; Basnar R.; Proracki, A.; Falletta, P.; Belanda, M.; Seto, P. *Int. J. Hydrogen Energy.* **2008**, 33, 3651–3659.
- Beckers, L.; Hiligsmann, S.; Masset, J.; Hamilton, C.; Thonart, P. *Energy Procedia.* **2012**, 29, 34–41.
- Lee, Z.K.; Li, S.L.; Lin, J.S.; Wang, Y.H.; Kuo, P.H.; Cheng, S.S. *Int. J. Hydrogen Energy.* **2008**, 33, 5234–5241.