

Producción de hidrógeno en cultivo por lotes de *Clostridium kluuyveri* utilizando etanol y acetato

Andrés Suazo*, Fabián Otálora, Jimmy Martínez, Fabián Véliz, Raúl Conejeros y Germán Aroca

Laboratorio de Cultivos Celulares, Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Av. Brasil 2085, Valparaíso, Chile

* Autor de correspondencia: andres.suazo@pucv.cl; Tel.: +(56)-958867229

Desarrollo Sustentable (Bioprocesos). Ponencia Presencial.

Recibido: 22 de agosto de 2023 Aceptado: 5 de octubre de 2023 Publicado: 23 de noviembre de 2023

Palabras clave: Biohidrógeno; Bioprocesos; Biocombustibles; Clostridium.

Introducción. *Clostridium* se presenta como un género prometedor dentro de las estrategias de producción de biohidrógeno, por su habilidad de transformar biomasa y residuos orgánicos en biocombustibles o precursores de estos (Wang & Yin, 2021). Dentro de este género, *Clostridium kluuyveri* tiene la capacidad de elongar cadenas carbonadas a partir de etanol y acetato, obteniéndose butirato, caproato y otros carboxilatos, a la vez que produce hidrógeno. Si bien, se ha descrito el mecanismo para producir hidrógeno, no se ha cuantificado la capacidad de esta bacteria de hacerlo. El objetivo de este estudio es determinar de forma cuantitativa la relación entre la producción de hidrógeno y las concentraciones de etanol y acetato iniciales utilizadas.

Materiales y Métodos. *Clostridium kluuyveri* DSM 555 se cultivó en medio DSMZ 52, utilizando viales de 500 mL con 250 mL de volumen de trabajo. La presión inicial del gas en el espacio de cabeza fue de 0.5 bar, con una composición de 27% CO₂ y 73% N₂. La concentración de biomasa se midió a través de densidad óptica a 600 nm. Las concentraciones de sustrato y producto se midieron por GC y HPLC. Los cultivos se monitorearon durante 50 horas. La presión del espacio de cabeza se midió antes de tomar cada muestra. Las concentraciones iniciales de etanol y acetato se definieron en base a un diseño experimental de media central composta circunscrita (Bouzid et al., 2020) donde los niveles 0 y ±1 para etanol y acetato fueron 0.34±0.17 y 0.17±0.085 M, respectivamente (Figura 1).

Resultados. Es posible apreciar en la Figura 1, que las máximas concentraciones de biomasa alcanzadas para los niveles de etanol -1, -v2 y 0 se mantienen en un rango de 0.24-0.29 g/L, diferenciándose principalmente la velocidad de crecimiento específica, que varía entre 0.07 y 0.12 h⁻¹, disminuyendo cuando hay mayor concentración inicial de acetato. Para los niveles de etanol +1 y +v2, las velocidades específicas de crecimiento varían entre 0.02 y 0.04 h⁻¹, lo que permite inferir una posible inhibición del crecimiento en función de la alta concentración inicial de etanol utilizado.

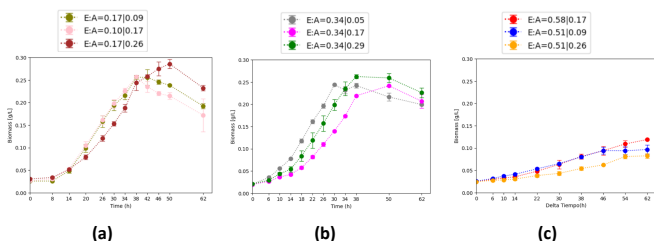


Figura 1. Cinética de crecimiento de biomasa, clasificados por nivel de etanol: (a) niveles -1 y -v2 (b) nivel 0 y (c) niveles +1 y +v2.

Las máximas productividades específicas de H₂ obtenidas para cada condición experimental se presentan en la Figura 2. De estas, la condición central (0.34 M etanol y 0.17 M de acetato inicial), obtuvo los mejores resultados, alcanzando 9.54±0.32 mmol H₂*(g cel *h)⁻¹. Este valor se sitúa a *C. kluuyveri* entre las mejores productividades específicas encontradas en cultivos por lote para bacterias del género

Clostridium (Wang y Ying, 2021). Con los resultados experimentales se determinó una ecuación de segundo orden para modelar la superficie de respuesta de productividad específica de hidrógeno.

$$q_{H_2} = -1.537X_1^2 - 0.646X_1 - 0.856X_2^2 + 0.077X_2 + 0.619X_1X_2 + 9.537 \quad (1)$$

De acuerdo con la Ecuación 1, el punto máximo se encuentra cercano al punto central, con concentraciones iniciales de etanol y acetato de 0.305 y 0.168 M, respectivamente.

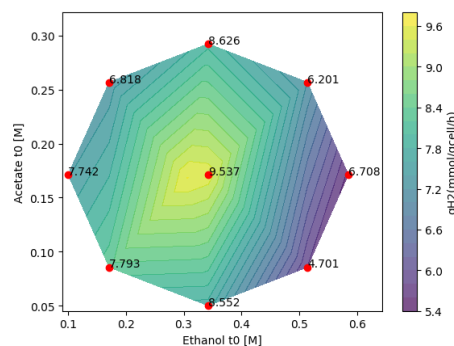


Figura 2. Superficie de respuesta de máximos de productividad específica de H₂ obtenidos para cada concentración inicial de etanol y acetato, versus los datos experimentales obtenidos (marcados en rojo).

El análisis de la composición del espacio de cabeza reveló también una disminución en el contenido de CO₂ en las primeras 30 horas. Esto se debe la capacidad de este microorganismo de fijar CO₂ para la producción de aminoácidos de cadena impar (Bornstein & Barker, 1948).

En la condición central, las concentraciones alcanzadas caproato y butirato fueron de 8.32 y 6.18 g/L, respectivamente, obteniendo rendimientos de 0.36 g_{caproato}/g_{etanol} y 0.50 g_{butirato}/g_{etanol}.

Conclusiones. Se determinó que existe un máximo de productividad específica de hidrógeno cercano al centro de las condiciones del diseño experimental. Los resultados obtenidos son el primer antecedente cuantitativo de producción de H₂ en *C. kluuyveri*, lo que permite establecer un parámetro comparativo con el resto de las especies del mismo género. Adicionalmente, se verificó la capacidad de fijar CO₂ y elongar cadenas carbonadas, lo que otorga a esta cepa una gran ventaja en el marco del desarrollo de procesos sustentables.

Bibliografía.

- Bornstein, B. T., & Barker, H. A. (1948a). The Nutrition of *Clostridium kluuyveri*. *Journal of Bacteriology*, 55(2), 223–230. <https://doi.org/10.1128/jb.55.2.223-230.1948>
- Bouzid, A.A., Pougnet, P., El Hami, A. 6—Meta-Model Development. In *Embedded Mechatronic Systems 2*, 2nd ed.; El Hami, A., Pougnet, P., Eds.; ISTE: 2020; pp. 157–187. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-190-1.50006-2>
- Wang, J., & Yin, Y. (2021). *Clostridium* species for fermentative hydrogen production: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(70), 34599–34625. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.08.052>