

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN UN BIOREACTOR A ESCALA BANCO EMPLEANDO BACTERIAS DE LA ESPECIE *Clostridium butyricum* A PARTIR DE CÁSCARAS DE BANANO (*Musa cavendish*).

**MARÍA ALEJANDRA LARA TRIANA
EDNA FERNANDA MÉNDEZ MONDRAGÓN**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C
2019**

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN UN BIOREACTOR A ESCALA BANCO EMPLEANDO BACTERIAS DE LA ESPECIE *Clostridium butyricum* A PARTIR DE CÁSCARAS DE BANANO (*Musa cavendish*).

**MARÍA ALEJANDRA LARA TRIANA
EDNA FERNANDA MÉNDEZ MONDRAGÓN**

**Proyecto de investigación para optar el título de:
INGENIERO QUÍMICO**

**Director
DIONISIO HUMBERTO MALAGÓN ROMERO
Dr. Ingeniero Químico**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C
2019**

Nota de aceptación

Ing. Oscar Libardo Lombana Charfuela
Jurado 1

Ing. Angie Tatiana Ortega Ramírez
Jurado 2

Bogotá D.C. Agosto 2019

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente Institucional y Rector del Claustro

Dr. MARIO POSADA GARCIA-PEÑA

Vicerrector de Desarrollo y Recursos humanos

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Decano Facultad de Ingenierías

Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI

Director del Programa de Ingeniería Química

Ing. Leonardo De Jesús Herrera Gutiérrez

Las directivas de la Fundación Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente al autor.

DEDICATORIA

Este proyecto está dedicado primeramente a Dios, por llenarme de bendiciones, por ser el forjador, acompañante y guía durante todo el camino que he recorrido a lo largo de mi carrera y de mi vida. A mis padres Omar Lara e Irma Triana, el motor de mi vida, por su esfuerzo, su confianza, su ejemplo y por entregarme su amor y apoyo incondicional día a día, porque sin ellos llegar a este punto no hubiera sido posible y, por ende, este logro es mas de ellos que mío. A mi hermano Juan Camilo Lara, por ser mi mejor compañía, por su inalcanzable entusiasmo y sentido del humor, mostrarme su amor infinito, por creer siempre en mí y por brindarme fuerzas para superar cualquier obstáculo, gracias. A mi amor Camilo Carrillo, por llegar a mi vida, por su entero cariño y confianza, por siempre creer en mí y en mis capacidades, por ser mi apoyo durante casi toda la carrera, darme fuerzas y alientos para superar las dificultades y obstáculos a lo largo de mi carrera y parte de mi vida, por apoyarme desde siempre. Este logro también es dedicado a toda mi familia estén donde estén y sin importar las distancias me han demostrado el valor del amor y la familia, especialmente mis abuelos, ellos fueron la mayor motivación para llevar a cabo este proyecto, y a pesar de que algunos no alcanzaron a acompañarme, estén donde estén se pueden sentir orgullosos. Finalmente, a mis amigos por emprender conmigo desde un inicio y a lo largo de la carrera este camino conmigo y enseñarme el valor de la amistad, en especial a mi compañera Edna Méndez, por su compromiso y esfuerzo para culminar este proyecto. A todos ellos, infinitas gracias.

María Alejandra Lara Triana

DEDICATORIA

Dedicó esta tesis primeramente a mi padre y abuela quienes, aunque ya no estén con nosotros, siempre han sido un ejemplo y un motor en mi vida. A mi madre, gracias a sus esfuerzo y dedicación mis estudios fueron posible y por lo tanto este proyecto, por su apoyo para no darme por vencida ante las dificultades y por creer en mí y darnos lo mejor siempre a Paula y a mí. A mi hermana por ser mi motivación e impulso. A mis tíos y primo por estar siempre a mi lado ayudándome, apoyándome y guiándome. A Álvaro por estar siempre a mi lado como un padre, bríndame sus consejos y ayuda en todo momento. A Mateo, mi amor, por estar en cada paso del camino, por no dejarme vencer por mis miedos y preocupaciones y creer en mí siempre, por la paciencia y por sacarme siempre una sonrisa en medio del estrés. A mis amigos quienes se convirtieron en mi pequeña familia y estuvieron siempre apoyándonos. A mi amiga y compañera de tesis Alejandra Lara por su dedicación y paciencia en el desarrollo del proyecto.

Edna Fernanda Méndez Mondragón.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestro director Dionisio Malagón Romero por su colaboración, compromiso, apoyo y orientación durante todo el desarrollo del presente proyecto, por brindarnos las herramientas necesarias para lograr finalizar de manera exitosa este trabajo y por guiarnos antes y después de cada paso dado. Al profesor Fernando Moreno por su orientación y colaboración en el tiempo que fue nuestro orientador en la universidad y aún después de no serlo. A la Universidad ECCI por abrirnos las puertas de sus instalaciones para el uso de sus laboratorios y equipos, en especial a la ingeniera Mónica Ballen y su equipo de trabajo, quienes, gracias a su acompañamiento, ayuda y conocimiento también fue posible finalizar este proyecto. A la Universidad Nacional de Colombia, por la colaboración prestada al proyecto desde su comienzo. Al Semillero de investigación Energía y Termo-fluidos y a la Universidad Santo Tomás por el préstamo y uso de sus laboratorios y equipos. Finalmente, agradecemos a la Universidad de América por los años de enseñanza brindados que permitieron tener los cimientos necesarios y conocimientos básicos para la realización del presente proyecto y por la orientación de los profesores en cada inquietud que surgió durante el desarrollo mismo.

CONTENIDO	pág.
INTRODUCCIÓN	24
OBJETIVOS	26
1. GENERALIDADES TEÓRICAS	27
1.1 BIOMASA RESIDUAL	27
1.1.1 Contenido energético de la biomasa residual	28
1.1.2 Procesos de transformación de la biomasa residual	29
1.2 INDUSTRIA BANANERA EN COLOMBIA	30
1.2.1 Naturaleza de la biomasa	30
1.2.2 Cáscara de banano como biomasa residual	31
1.2.3 Biomasa lignocelulosa	32
1.3 BIOHIDRÓGENO COMO COMBUSTIBLE	33
1.3.1 Fermentación oscura	34
1.4 MICROORGANISMO: GÉNERO <i>Clostridium</i>	35
1.4.1 Factores de crecimiento	39
1.5 ESCALAMIENTO	42
2. ESTABLECIMIENTO DE LOS PARÁMETROS PARA LA FERMENTACIÓN DE LA CÁSCARA DE BANANO A ESCALA LABORATORIO	46
2.1 MÉTODOS	46
2.1.1 Recolección de la cáscara	46
2.1.2 Pretratamiento de la cáscara	47
2.1.2.1 Lavado de las cáscaras	47
2.1.2.2 Secado de las cáscaras	48
2.1.2.3 Proceso de molienda	49
2.1.2.4 Proceso de tamizado	49
2.1.3 Caracterización de la cáscara molida	52
2.1.4 Extracción de carbohidratos	54
2.1.4.1 Hidrólisis alcalina	57
2.1.4.2 Extracción a base de agua	58
2.1.4.3 Hidrólisis ácida	58
2.1.4.4 Extracción a base agua e hidrólisis ácida	58
2.1.5 Comprobación del proceso fermentativo	59
2.1.5.1 Visualización de las células	59
2.1.5.2 Medio sólido en agar básico	60
2.1.5.3 Medio líquido en RCM	60
2.1.6 Fermentación a escala laboratorio	61
2.1.6.1 Pre-inoculación	62

2.1.6.2 Inoculación	62
2.1.6.3 Cuantificación de biomasa, medición de ph, determinación de solventes y ácidos grasos, consumo de sustrato y determinación de hidrógeno	62
2.1.6.5 Degradación de la cáscara	63
2.2 RESULTADOS	63
2.2.1 Recolección de la cáscara	63
2.2.2 Pretratamiento de la cáscara	64
2.2.2.1 Lavado de las cáscaras	64
2.2.2.2 Secado de las cáscaras	65
2.2.2.3 Proceso de molienda	66
2.2.2.4 Proceso de tamizado	67
2.2.2.5 Balance de materia global	70
2.2.3 Caracterización de la cáscara molida y tamizada	71
2.2.4 Extracción de carbohidratos	72
2.2.4.1 Hidrólisis alcalina	73
2.2.4.2 Extracción a base de agua	75
2.2.4.3 Hidrólisis ácida	76
2.2.4.4 Extracción a base de agua e hidrólisis ácida	77
2.2.5 Comprobación del proceso fermentativo	80
2.2.5.1 Visualización de la cepa	80
2.2.5.2 Medio sólido de agar básico	81
2.2.5.3 Medio líquido en RCM	81
2.2.6 Fermentación a escala laboratorio	82
2.2.6.1 Pre-inoculación	82
2.2.6.2 Inoculación	83
2.2.6.3 Cuantificación de la biomasa y medición de ph a escala laboratorio	83
2.2.6.4 Determinación de solventes/ácidos grasos y consumo de sustrato	86
2.2.6.5 Determinación de hidrógeno	89
2.2.6.6 Degradación de la cáscara	91
3. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES ADECUADAS PARA EL ESCALAMIENTO	93
3.1 ESPECIFICACIONES DEL BIOREACTOR	93
3.1.1 Características generales	93
3.1.2 Equipos y accesorios complementarios	93
3.1.3 Modo operativo del biorreactor	95
3.2 PARAMETROS SELECCIONADOS PARA EL ESCALAMIENTO	97
4. DESARROLLO DEL PROCESO FERMENTATIVO DE LA CÁSCARA DE BANANO A ESCALA BANCO	99
4.1 MÉTODOS	99
4.1.1 Pre-inoculación	99
4.1.2 Medio de cultivo	99

4.1.3 Inoculación	99
4.1.4 Cuantificación de biomasa, medición de pH, determinación de solventes y ácidos grasos, consumo de sustrato y determinación de hidrógeno	100
4.1.5 Degradación de la cáscara	100
4.2 RESULTADOS	101
4.2.1 Pre-inoculación e inoculación	101
4.2.2 Cuantificación de la biomasa y medición de pH	101
4.2.3 Determinación de solventes/ácidos grasos y consumo de sustrato	102
4.2.4 Determinación de hidrógeno	103
4.2.5 Degradación de la cáscara	104
5. CONCLUSIONES	106
6. RECOMENDACIONES	107
BIBLIOGRAFÍA	108
ANEXOS	120

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Fenómenos de importancia para el escalado en bioprocesos	44
Tabla 2. Tamaño de mallas	49
Tabla 3. Metodología de la caracterización	53
Tabla 4. (Continuación) Metodología de la caracterización	53
Tabla 5. Condiciones del diseño	55
Tabla 6. Diseño de experimentos para la hidrólisis alcalina	57
Tabla 7. Diseño de experimentos para la hidrólisis con agua	58
Tabla 8. Composición RCM. Composición RCM	61
Tabla 9. Diámetros, pesos retenidos y fracción másica retenida en cada una de las mallas	68
Tabla 10. Balance global de materia del pretratamiento de la cascara	70
Tabla 11. Composición de la biomasa residual en base seca	71
Tabla 12. Contantes de velocidad de crecimiento en los intervalos de tiempo	86
Tabla 13. Medidas del bioreactor	93
Tabla 14. Equipos y accesorios del bioreactor	94

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. PCI para biomasa residual en Colombia	28
Cuadro 1. (Continuación) PCI para biomasa residual en Colombia	29
Cuadro 2. ANOVA (hidrólisis alcalina)	73
Cuadro 3. ANOVA (extracción a base de agua)	76
Cuadro 4. Priorización del tipo de hidrólisis empleada para la extracción de azúcares de la cáscara de banano	79
Cuadro 5. Priorización en cuanto a la concentración de cáscara con respecto a la determinación de hidrógeno	91
Cuadro 6. Degradación de la cáscara a escala laboratorio	91

LISTA DE GRÁFICOS

	pág.
Gráfica 1. Curva de secado de la cáscara de banano a temperatura constante	66
Gráfica 2. Curva de análisis de tamizado	68
Gráfica 3. Cinética de hidrólisis alcalina	73
Gráfica 4. Superficie de respuesta de la hidrólisis alcalina	75
Gráfica 5. Cinética de extracción con agua	75
Gráfica 6. Cinética de hidrólisis ácida (HCl al 0,29M)	77
Gráfica 7. Cinética de la segunda hidrólisis realizada con HCl	78
Gráfica 8. Crecimiento bacteriano y medición de pH al 0% cáscara de banano	84
Gráfica 9. Crecimiento bacteriano y medición de pH al 2,5% cáscara de banano	84
Gráfica 10. Crecimiento bacteriano y medición de pH al 5% cáscara de banano	85
Gráfica 11. Consumo de sustrato y metabolitos al 0% de cáscara	87
Gráfica 12. Consumo de sustrato y metabolitos al 2,5% de cáscara	87
Gráfica 13. Consumo de sustrato y metabolitos al 5% de cáscara	88
Gráfica 14. Producción de hidrógeno a escala laboratorio	90
Gráfica 15. Cuantificación de la biomasa y medición de pH en el bioreactor	101
Gráfica 16. Metabolitos líquidos producidos en la fermentación	102
Gráfica 17. Producción de hidrógeno en el bioreactor	103
Gráfica 18. Degradación de la cáscara en el bioreactor y crecimiento celular	105

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Material Lignocelulósico	32
Figura 2. Producción de biohidrógeno por vías biológicas	34
Figura 3. Ruta metabólica del hidrógeno en <i>C. butyricum</i>	37
Figura 4. Pasos para escalamiento a nivel industrial	42
Figura 5. Índice de color de la escala comercial de la cáscara de banano	46
Figura 6. Diagrama de proceso de la recolección de la cáscara	47
Figura 7. Diagrama de proceso para las hidrólisis	59
Figura 8. Balance de materia para el proceso de lavado	64
Figura 9. Balance de materia para el proceso de secado	65
Figura 10. Balance de materia del proceso de molienda	67
Figura 11. Balance de materia del proceso de tamizado	67
Figura 12. Diagrama de bloques para el balance de materia global	70
Figura 13. Representación esquemática del sistema de agitación	95
Figura 14. Representación esquemática del bioreactor	97
Figura 15. Diagrama de proceso de la fermentación a escala banco	100

LISTA DE ILUSTRACIONES

	pág.
Ilustración 1. Muestras de cáscara adheridas	52
Ilustración 2. Recubrimiento con el sputter	52
Ilustración 3. Sistema de reflujo continuo	55
Ilustración 4. Cáscaras días previos a la experimentación	64
Ilustración 5. Estructura de la cáscara de banano sin moler y molida	69
Ilustración 6. Tinción de Gram	80
Ilustración 7. Medios en agar básico	81
Ilustración 8. Medio preparado en RCM con cáscara de banano	82
Ilustración 9. Medio original y pre inoculo	83
Ilustración 10. Bioreactor	94
Ilustración 11. Solidos totales obtenidos por muestra de cascara de banano	104

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Formación de biomasa	38
Ecuación 2. Formación de acetato	38
Ecuación 3. Formación de butirato	38
Ecuación 4. Porcentaje de Humedad	48
Ecuación 5. Diámetro de partícula	50
Ecuación 6. Fracción másica retenida	50
Ecuación 7. Diámetro medio de masa	50
Ecuación 8. Porcentaje de retención parcial	51
Ecuación 9. Porcentaje de retención acumulado	51
Ecuación 10. Porcentaje pasante acumulado	51
Ecuación 11. Constante de velocidad	63

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. De resultados correspondientes a la curva de humedad para dos muestras de cáscara de banano madura	121
Anexo B. Análisis de tamizado	122
Anexo C. Análisis proximal de resultados en base seca de la cáscara de banano pretratada	123
Anexo D. Curva de patrón para el método de dns y espectrofotometría y diluciones de la extracción	124
Anexo E. Cromatografía de gas a escala laboratorio	128
Anexo F. Cromatografía de gas a escala banco	129
Anexo G. Superficie de respuesta para la hidrólisis alcalina	130

NOMENCLATURA

ANOVA	Análisis de varianza.
AVG	Ácidos grasos volátiles.
C/N	Relación carbono nitrógeno.
CHONS	Carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre.
GC	Gas chromatography
H₀	Hipótesis nula.
H₁	Hipótesis alterna.
HPLC	High performance liquid chromatography
IBUN	Instituto de biotecnología de la Universidad Nacional
PCI	Poder calorífico inferior.
RCM	Medio reforzado de <i>Clostridium</i> .
RSU	Residuos sólidos urbanos.

RESUMEN

La alta cantidad de residuos de banano que se producen en Colombia y que son desaprovechados, termina siendo un problema para las zonas productoras del país. Diversas alternativas se han evaluado para su aprovechamiento, sin que hasta el momento se haya definido una de ellas. Mediante la ejecución de este proyecto, se evaluó la producción de hidrógeno, como alternativa energética, mediante la fermentación empleando *Clostridium butyricum* a partir de los residuos sólidos de cáscara de banano.

En primera instancia se realizó la recolección, pre-tratamiento y caracterización de la biomasa residual. La cáscara fue lavada y secada para ser molida y tamizada con el fin de la adecuación y selección del tamaño de partícula apropiado para la fermentación. Se realizó un análisis de SEM para determinación de morfología y corroboración del tamaño de partícula obtenida. La biomasa recolectada fue caracterizada en cuanto a contenido de celulosa (8.64%), hemicelulosa (14.16%), lignina (9.76%) y CHONS (39.37%, 5.67%, 39.37%, 1.2%, 0.11% respectivamente).

Finalizada la caracterización, se procedió a ejecutar la fermentación de la cáscara agregándola directamente al medio. Se evaluaron dos concentraciones de cáscara de banano (2,5% y 5%) y fueron comparadas con un ensayo control (0%). Se tomaron muestras líquidas y de gas cada 8 horas durante 56 horas, las muestras de gases fueron enviadas a cromatografía de gas GC y las muestras líquidas fueron utilizadas para la cuantificación de la biomasa y posteriormente separadas y enviadas a cromatografía líquida HPLC. Se logró obtener una concentración máxima de 156.61 mmol H₂/L y 157.54 mmol H₂/L en los medios con concentraciones de cáscara al 2,5% y 5% respectivamente y se alcanzó un porcentaje de degradación de 7.72±2.88% y 29.12±1.73% respectivamente.

Con los resultados obtenidos, se seleccionaron los parámetros adecuados para la fermentación a escala banco con un volumen de trabajo en el bioreactor de 2.5L, y se seleccionó según el porcentaje de degradación y la concentración de hidrógeno obtenida a escala laboratorio una concentración del 5% de cáscara de banano. Se evaluó la producción de hidrógeno en el bioreactor con lo cual se logró una máxima concentración de hidrógeno de 668.4 mmol/L y un porcentaje de degradación del 94.97% del total de la cáscara de banano en el medio.

Palabras clave: Bioreactor, cáscara de banano, *Clostridium butyricum*, hidrógeno.

GLOSARIO

ANAEROBIOS: son microorganismos que tienen la capacidad de vivir en ausencia de oxígeno y por lo tanto pueden realizar su metabolismo en estas condiciones.

ACIDOGENESIS: primera etapa de la fermentación acetobutilica que comprende la conversión de moléculas simples como aminoácidos y azúcares en hidrógeno y ácidos orgánicos como el ácido acético y butírico por actividad de enzimas hidrolíticas por parte de bacterias de tipo acidogénicas.

BACTERIAS ACIDOGÉNICAS: son microorganismos capaces de transformar la biomasa residual en ácidos grasos volátiles, dióxido de carbono e hidrógeno en un ambiente completamente anoxido.

BIOHIDRÓGENO: es una fuente de energía en estado gaseoso el cual hace parte de la mezcla de gases que resultan en la fermentación oscura como producto principal, es el mismo hidrógeno, pero se le llama biohidrógeno al ser obtenido por medio de procesos biológicos.

BIOMASA RESIDUAL: son subproductos o residuos biológicos provenientes de actividades biológicas que pueden ser aprovechadas para la obtención de energía por sus características biodegradables. En este proyecto la biomasa residual corresponde a la cáscara de banano.

BIOMASA LIGNOCELULÓSICA: subproductos o residuos biológicos de tipo agrícola con presencia de material lignocelulosico como la cáscara de banano.

BIOREACTOR: Es un reactor tipo batch de 5 litros que cuenta con un agitador que permite la homogenización de la mezcla que contenga.

CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO: es determinar e identificar la composición del residuo de interés, en este caso, de la cáscara de banano. Esto, para determinar si la biomasa cuenta con las condiciones nutricionales necesarias para utilizarla como fuente de carbono.

CATABOLISMO: proceso metabólico que no requieren gasto energético debido a que las moléculas más complejas como la biomasa residual son degradadas en otras más simples.

CONTENIDO ENERGÉTICO DEL RESIDUO: es el poder calorífico que contiene el material orgánico el cual es liberada en los procesos de transformación de la biomasa para la obtención de energía.

DEGRADACIÓN: consiste en la descomposición del residuo bajo determinadas condiciones ambientales.

ENERGÍA RENOVABLE: es la energía que se obtiene de los recursos que se encuentran en el medio ambiente y por tanto tienen la característica de ser inagotables, debido a esto se considera el uso de residuos agrícolas para la obtención de energía renovable.

ESCALAMIENTO: es convertir un proceso desde su estado de investigación, lo que se conoce como escala laboratorio a un proceso de producción en masa que se considera como una escala industrial. En este proyecto el escalamiento es considerado desde escala laboratorio hasta escala banco.

ESPORULACIÓN: es el mecanismo de defensa de las bacterias *spp. Clostridium* para sobrevivir en ambientes hostiles y producir esporas altamente resistentes.

FERMENTACIÓN ACETOBUTILICA: proceso de transformación bacteriana a partir de carbohidratos en acetona, butanol y etanol. También es conocida como fermentación ABE.

FERMENTACIÓN OSCURA: es un proceso biológico en el cual ocurren transformaciones de la biomasa residual en otros compuestos orgánicos simples, el proceso se lleva a cabo en ausencia de luz y de oxígeno gracias a la acción de microorganismos o fermentos de tipo anaerobios.

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: degradación de la biomasa en moléculas más simples donde las bacterias participantes excretan enzimas para efectuar la degradación y de esta manera poder comenzar la fermentación.

MATERIAL LIGNOCELULÓSICO: está comprendido entre celulosa, hemicelulosa (ambos son llamado holocelulosa) y lignina que conforman la pared rígida de las paredes celulares de las células vegetales formando una barrera contra la biodegradación.

PRETRATAMIENTO: transformación física a la que es sometida la biomasa residual con el fin de acondicionar el material orgánico y facilitar la degradación de la cáscara por parte de las bacterias.

SOLVENTOGENESIS: segunda etapa de la fermentación acetobutilica provocada por la acidificación del medio en la primera etapa. Donde los ácidos generados en la acidogénesis son reconsumidos y convertidos en alcoholes como etanol por parte de las bacterias de acidogénicas.

SUSTRATO: también se llama fuente de carbono. Hace referencia a la biomasa residual como el suplemento principal que los microorganismos requieren debido a

la presencia de carbono para el desarrollo y crecimiento del mismo. En este trabajo el sustrato empleado fue la cáscara de banano.

INTRODUCCIÓN

La energía proveniente de combustibles fósiles es uno de los grandes desafíos a los que se ve enfrentado el mundo hoy en día. En la actualidad, el hecho de que la mayor parte de energía empleada a nivel mundial sea proveniente de combustibles fósiles es debido a su gran contenido energético lo cual permite satisfacer las necesidades básicas de la humanidad, sin embargo, el problema radica en que estos recursos que se encuentran en la naturaleza como el petróleo y el gas natural se han ido agotando con el pasar del tiempo provocando que la producción de energía sea cada vez sea más limitada. Además, su combustión produce gases nocivos para la atmósfera como el dióxido de carbono, cuya producción en exceso genera serios problemas de contaminación en el medio ambiente.

La acumulación de residuos orgánicos principalmente de tipo agrícola es masiva en Colombia, puesto que la cantidad de residuos sólidos orgánicos representan el 70% del volumen total de los residuos generados en el país¹. Uno de los principales productos agrícolas que produce el país y que genera gran cantidad de residuos es la industria bananera. Según La Asociación de Bananeros de Colombia (AUGURA), Colombia tuvo una producción de 98,4 millones de cajas de banano en el año 2017². Esto indica que eventualmente se están generando residuos del mismo sumando una problemática más al que debe enfrentar el país en cuestión de residuos.

Por lo anterior, el uso y agotamiento de combustibles fósiles como fuente de energía y el aumento de la cantidad de residuos agrícolas como el banano contribuyen a la búsqueda de alternativas que permitan la obtención de un combustible amigable con el ambiente y además que proporcione un alto nivel energético he inclusive mejor que el que proporciona un combustible fósil. Tal es el caso de los biocombustibles, grandes promotores de energía generado a partir de procesos biológicos: La fermentación oscura, permite la obtención de un biocombustible a partir de biomasa residual como lo es el biohidrógeno, este es obtenido de manera simultánea con ácidos volátiles durante las primeras etapas de la digestión anaerobia (Hidrólisis enzimática y acidogénesis) por acción únicamente de bacterias acidogénicas y dado que es un proceso biológico se considera una fuente energética renovable y limpia. El biohidrógeno resultante se destaca entre otros biocombustibles debido al alto nivel calorífico que presenta (141.86 MJ/kg ≈39.41 Kh/kg) y el contenido de energía por unidad de peso que tiene es muy alto en comparación a cualquier otro combustible, de la misma manera su combustión no genera contaminación alguna para el medio ambiente ya que a emisión de dióxido

¹ JARAMILLO, Gladys y ZAPATA, Liliana. Aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos en Colombia. Antioquia: Universidad de Antioquia, facultad de ingeniería 2008. 19 p.

² FINAGRO. Fondo para el financiamiento el sector agropecuario-2018. [Citado 14 de agosto de 2018] Disponible en: <https://www.finagro.com.co/sites/default/files/node/basic-page/files/ficha_banano_version_ii.pdf>

de carbono durante este proceso es muy baja o inclusive nulo y el único subproducto resultante durante su combustión es agua³.

El Semillero de investigación Energía y Termo-fluidos de la Universidad Santo Tomás ha venido trabajando en el desarrollo de proyectos en energías alternativas a partir de fuentes renovables. En esta vía han desarrollado un bioreactor para la obtención de biocombustibles principalmente a partir de procesos fermentativos por distintos tipos de biomasa. El presente proyecto a desarrollar pretende evaluar la producción de biohidrógeno en dicho bioreactor, evaluando la viabilidad del proceso desde escala laboratorio utilizando cepas de la especie *Clostridium butyricum*, especies que durante su procesos fermentativos tienen la capacidad de producir hidrógeno como uno de los gases resultantes y empleando como biomasa residual las cáscaras de banano siendo esta una alternativa al aprovechamiento de residuos agrícolas del país y contribuyendo así a una de las tantas alternativas para la obtención de este biocombustible.

³ GUERVOS, María. EL HIDRÓGENO COMO ALTERNATIVA ENERGETICA DEL FUTURO. [Citado 9 de agosto de 2018] Disponible en: <<http://estherguervos.galeon.com/2ha.pdf>>

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de hidrógeno en un bioreactor a escala banco empleando bacterias de la especie *Clostridium butyricum* a partir de cáscaras de banano (*Musa cavendish*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer los parámetros para la fermentación de la cáscara de banano a escala laboratorio.
2. Seleccionar las condiciones adecuadas para el escalamiento.
3. Desarrollar el proceso fermentativo a escala banco.

1. GENERALIDADES TEÓRICAS

Los combustibles fósiles corresponden a la energía que es obtenida a partir de la descomposición de la biomasa perteneciente a eras pasadas. La explotación de estos recursos para satisfacer las necesidades del ser humano ha traído consigo el deterioro del medio ambiente a lo largo de los años y en consecuencia el agotamiento de estos recursos, de manera que el ser humano se ha visto en la tarea de buscar alternativas que le permitan solventar el problema. La obtención de biohidrógeno a partir del aprovechamiento de biomasa residual es una posible solución que resulta ser atractiva, el porqué, los conceptos básicos, ideas y temas a tener en cuenta se encuentran expuestos en el presente capítulo.

1.1 BIOMASA RESIDUAL

El término biomasa es aquel que corresponde a todo material orgánico que procede de origen animal, vegetal o también aquel material procedente de alguna transformación natural o artificial de la misma⁴. La biomasa es una de las alternativas más significativas en estudio debido a que su energía almacenada es utilizada para sustituir la energía producida por los combustibles fósiles⁵, dicha energía es generada gracias a la fotosíntesis que realizan las plantas al aprovechar la energía solar, y por tanto se consideran fuentes de energía renovable. Por otro lado, los combustibles fósiles, tales como el petróleo o el gas natural, también se consideran recursos orgánicos pero no son renovables debido al tiempo requerido (millones de años) para la transformación del carbono que da paso a la obtención de estos combustibles⁶. La biomasa residual corresponde a los desechos generados por la misma materia orgánica⁷, estos desechos son el resultado de transformaciones tanto naturales como industriales⁸. Dicha biomasa puede ser considerada una fuente energética y puede ser integrada a diversos procesos industriales⁹.

⁴NOGUÉS, Fernando; GARCÍA, Daniel y REZEAU, Adeline. Energías renovables, Energía de la biomasa. Zaragoza: Prensas universitarias de Zaragoza, 2010. p.16. ISBN: 978-84-92774-91-3.

⁵ROMERO, Arturo. Aprovechamiento de la biomasa como fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles. En: Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Física, Naturales. 2010. vol 104. p. 331-345

⁶ORGAZ, Arturo. Energía renovable: la biomasa. Empresa provincial de energía en Córdoba (EPEC). 0351- 429 6736. p.2.

⁷ELIAS, Xavier. Biomasa y bioenergía: energía, agua, medioambiente, territorialidad y sostenibilidad. Madrid: Ediciones Diaz de Santos. 2012. p. 753. ISBN: 978-84-9969-125-1.

⁸ESCALANTE, Humberto; ORDUZ, Janneth; ZAPATA, Henry; CARDONA, María; DUARTE, Marta. Atlas del potencial energético de la biomasa residual en Colombia. Unidad de planeación minero-energética (UPME 2008). p.118. ISBN: 978-958-8504-59-9.

⁹GIROTTI, Francesca; ALIBARDI, Luca; COSSU, Raffaello. Food waste generation and industrial uses: A review. En: Waste Management. Junio, 2015.vol. 45. p. 32-41.

1.1.1 Contenido energético de la biomasa residual. El contenido energético de la biomasa residual corresponde al poder calorífico que contenga el material orgánico, el cual es definido como la cantidad de energía calórica por unidad de masa¹⁰. El contenido energético liberado en los procesos de transformación de la biomasa residual para la obtención de energía es cuantificado por una variable llamada poder calorífico inferior (PCI). El aprovechamiento de la energía del residuo está relacionado con su composición, puesto que, la biomasa residual contiene compuestos con un alto poder calorífico como lo son el oxígeno y los compuestos volátiles¹¹; e igualmente cuenta con la presencia de carbono e hidrógeno¹². El cuadro 1 muestra el PCI para la biomasa residual en Colombia.

Cuadro 1. PCI para biomasa residual en Colombia.

SECTOR	BIOMASA	PCI	
		kcal/Kg	Mj/Kg
PECUARIO			
Avícola	Ponedoras	2,248	9,4
	Engorde	3,645	15,3
Porcícola	Tecnificado	6,049	25,3
	No tecnificado	4,163	17,4
Bovino	Leche	2,801	11,7
	Doble propósito	3,68	15,4
	Carne	3,783	15,8
AGRÍCOLA			
Palma de aceite	Cuesco	3,988	16,7
	Fibra	4,274	17,9
	Raquis	4,021	16,8
Caña de azúcar	Rac	3,684	15,4
	Bagazo	4,456	18,6
Caña de panela	Bagazo	4,456	18,6
	Hojas secas	4,007	16,8
	Rac	3,684	15,4
Café	Pulpa	4,259	17,8
	Cisco	4,43	15,5
	Tallos	4,384	18,3
Maíz	Rastrojo	3,429	14,3
	Tusa	3,39	14,2
	Capacho	3,815	16

¹⁰ Biomass users network Centroamérica – BUN-CA. Biomasa, manuales sobre energía renovables para América Central. San José C.R.:2002. 10 p. ISBN: 9968-904-02-3.

¹¹ SECRETARIA DE ENERGÍA. Op., cit., página 6.

¹² ESCALANTE. Op., cit., página 123.

Cuadro 2. (Continuación).

	Hojas secas	4,274	15,9
Arroz	Tamo	3,113	13
	Cascarilla	3,603	15,1
Banano (Musa Cavendish)	Raquis	1,809	7,6
	Vástago	2,032	8,5
Plátano	Rechazo	2,488	10,4
	Raquis	1,808	7,6
	Vástago	2,032	8,5
URBANO			
RSU	Plaza de mercado	3,772	15,8
	Centro de acopio	3,772	15,8
	Poda	3,772	15,8

Fuente: UPME. Valorización energética de residuos: Proyecto WTE Colombia (2018)

1.1.2 Procesos de transformación de la biomasa residual. Los procesos utilizados para la conversión de la biomasa residual en energía se realizan por medio de procesos térmicos y biológicos¹³. Esta transformación en energía depende de muchos aspectos que influyen en la selección de tecnología y métodos para realizar la conversión puesto que se tiene que tener en cuenta el tipo de biomasa seleccionada y las propiedades fisicoquímicas, bioquímicas y energéticas del residuo¹⁴. La energía contenida en la biomasa residual puede ser recuperada y aprovechada para beneficio del hombre, dando paso a la obtención de combustibles en cualquier estado de materia (sólida, líquida o gaseosa) a partir de cualquier tipo de biomasa¹⁵. El presente proyecto se desarrolla por medio de procesos de transformación biológica, esta vía se destaca dentro de las nuevas tecnologías de transformación gracias a las ventajas con las que cuenta. Además de permitir el aprovechamiento de diferentes tipos de biomasa residual (fuentes renovables), es amigable con el medio ambiente dado que los productos obtenidos no presentan contaminación alguna y además los subproductos obtenidos durante el proceso pueden ser reutilizados¹⁶. El uso y selección de los microorganismos favorece al proceso de transformación de la biomasa según el producto de interés, esto es posible por medio de la manipulación de la ruta metabólica y dependiente del tipo

¹³ ESCALANTE. Op., cit., página 125.

¹⁴ Ibid.p.125

¹⁵ GÓMEZ, Alexander, *et al.* Transformación termoquímica de la biomasa residual del proceso de extracción del aceite de palma: tecnologías y perspectivas. En: Revista Palmas. 2004. vol. 25. p. 388-397.

¹⁶ LUONG N., *et al.* Application of rumen and anaerobic sludge microbes for bio harvesting from lignocellulosic biomass. En:Chemosphere. Abril, 2019. 703 p.

de microorganismo seleccionado según su capacidad de producir determinado producto o subproducto en específico durante el proceso biológico, el cual permite el desarrollo del proceso a condiciones de temperatura ambiente y presión atmosférica con la continua producción del producto de interés¹⁷.

1.2 INDUSTRIA BANANERA EN COLOMBIA

El banano (*Musa cavendish*) es una de las frutas más importadas a nivel mundial, con una importación alrededor de 17 millones de toneladas, finalizando el año 2016 y comenzando el año 2017¹⁸. Su consumo se extiende originando un impacto directo de manera significativa en la economía global y en el medio ambiente debido a los residuos generados por esta industria¹⁹. En Colombia, las zonas que corresponden a los departamentos del Magdalena, Antioquía y especialmente la región de Urabá cuentan con 49.307 hectáreas de siembra bananera en total²⁰, que representan entre 10% y 12% de las exportaciones de banano en el mundo²¹, es importante resaltar que el banano se destaca siendo el segundo producto más exportado por Colombia después del café, generando ingresos al país de 850 millones de dólares al año aproximadamente²². Esta producción de banano es aproximadamente 1.968 millones de toneladas de banano, lo que representa alrededor de 551 millones de toneladas de residuos de cáscara de banano anual²³.

1.2.1 Naturaleza de la biomasa. El banano es un producto agrícola de clima tropical proveniente de una planta herbácea²⁴ y su origen está dado en el continente asiático principalmente en la India²⁵. La fruta se encuentra en la familia de las musáceas (género *Musa*), sin embargo, la clasificación taxonómica del banano resulta ser algo compleja, ya que con el pasar de los años han habido entrecruzamientos que transcurren en la naturaleza, entre diferentes especies, dando origen a un sin número de nuevos híbridos²⁶. Dentro de las principales y más

¹⁷ CORRALES, Luisa, *et al.* Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. En: Revista NOVA. Noviembre, 2015. 58p.

¹⁸ Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Situación del mercado del Banano 2015-2016. [Citado 27 de mayo de 2019]. Disponible en: <<http://www.fao.org/3/a-i7410s.pdf>>

¹⁹ HOUSAGUL, Saowaluck. Biomethane production from co-digestion of banana peel and waste glycerol. *En*: Energy Procedia. 2014. vol. 61. p. 2219 – 2223.

²⁰ Asociación de Bananeros de Colombia (Augura) 2017. Coyuntura bananera en Colombia. [Citado 16 de agosto de 2018]. Disponible en: <<http://www.augura.com.co/wp-content/uploads/2015/08/COYUNTURA-BANANERA-2017.pdf>>

²¹ *Ibid.* p.4.

²² *Ibid.* p. 9.

²³ *Ibid.* p. 9.

²⁴ Estación Experimental de Cultivos Tropicales – INTA Yuto – Jujuy [Citado 16 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-cultivo_del_banano.pdf>

²⁵ GAVIRIA. Op., cit., página 9.

²⁶ *Ibid.* p.7.

destacadas variedades de banano que surgen en las tierras colombianas sobresalen: *gran enano*, *william* y *cavendish*²⁷.

El color de la cáscara se considera como un indicativo de las condiciones de maduración de la fruta²⁸. Cuando el banano está en su etapa de vida verde el fruto no es comestible, tiene textura dura y tanto la cáscara verdosa como la pulpa es rica en almidón, medida que empieza a madurar, el color de la fruta va tornándose amarilla y el almidón comienza a transformarse en azúcares más simples: glucosa, fructosa y sacarosa²⁹. Una vez la banana tenga un color amarillo brillante y sin trazas de verde, es cuando el banano se encuentra apto para el consumo³⁰.

1.2.2 Cáscara de banano como biomasa residual. Los residuos agrícolas generados por la industria agro-colombiana es un tema de suma preocupación, tan solo el 70% del volumen total de los residuos generados en el país corresponden a residuos sólidos orgánicos³¹. Gracias a la cantidad de banano que se produce, la industria bananera colombiana contribuye con la generación de dichos desechos. A partir de un racimo únicamente se utiliza entre el 20% y 30% de su biomasa y el restante se convierte en residuo³², de esta biomasa residual las cáscaras del banano representan entre el 35% y 40% del fruto³³. Por tanto, el aprovechamiento de estos residuos, implementando algún proceso de transformación, es una efectiva solución para ayudar a resolver el problema de los residuos en el país. Sin embargo, para lograr dicha conversión es importante tener en cuenta la composición de la cáscara de banano.

²⁷ GAVIRIA, Juan Carlos. Evaluación del efecto del corte del pseudotallo en la planta madre, sobre los rendimientos del fruto y tiempo de floración en hijos de sucesión de la segunda generación en banano de variedad (*Cavendish valery*). Tesis de maestría. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, 2016. 1p.

²⁸ ORCHARD, J. y DABZIE, B.. Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de banano s y plátanos: criterios y métodos. Pensilvania:1997. 16p.

²⁹ ORDÓÑEZ, Arturo Gabriel. Diseño de un proceso para la maduración acelerada de banano utilizando etefón como agente madurador. Tesis de pregrado. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2005. 13p.

³⁰ AURORE, G.; PARFAIT, B. y FAHRASMANE, L. Bananas, raw materials for making processed food products En: Trends in Food Science & Technology. 2009. vol. 20. p.78-91.

³¹ JARAMILLO. Op., cit., página 19.

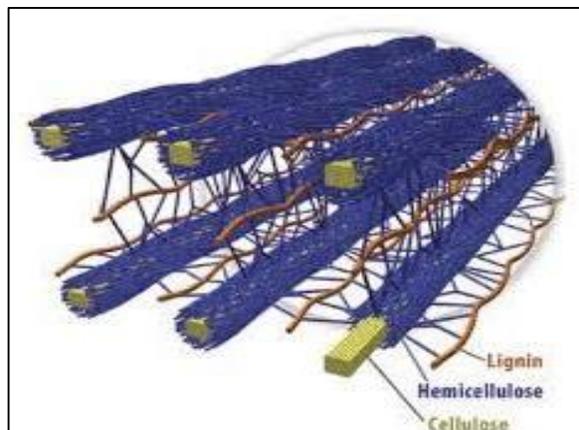
³² MAZZEO, Miguel, *et al.* Aprovechamiento industrial de residuos de cosecha y poscosecha del plátano en el departamento de caldas. En: Revista en educación en ingeniería N° 9. Junio, 2010. 129 p. ISSN 1900-8260.

³³ YUSUFU, P.A.; MOSIKO, T.B. y OJUKO, O.O.. Effect of firm ripe plantain fruit flour addition on the chemical, sensory and microbial quality of *fura* powder. En: Official journal of Nigerian institute of food science and technology N° 1. Mayo, 2015. vol. 32, 38-44 p.

La cáscara de banano presenta ciertas características que la clasifica como biomasa residual gracias a su composición y contenido de azúcares³⁴. La cáscara cuenta con un porcentaje de humedad de 86% y el 14% corresponde a sólidos, de los cuales el 7% es de grasa, 21% de azúcares reductores, 11% de fibra cruda, 60% de extracto libre de Nitrógeno aproximadamente³⁵; esto nos muestra que efectivamente esta biomasa que es biomasa residual puede ser aprovechada debido al contenido de azucares reductores en peso seco.

1.2.3 Biomasa lignocelulosa. El material lignocelulósico se encuentra en la mayoría de los residuos de tipo agrícola en sus células estructurales como en la cáscara de banano^{36, 37}. En varios estudios realizados por medio de microscopía espectroscopía de infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR), se observan bandas de lignina y un grupo carbonilo perteneciente a bandas de hemicelulosa de la cáscara de banano³⁸. La figura 1 muestra la estructura del material lignocelulósico.

Figura 1. Material Lignocelulósico.



Fuente: SILVA, V., Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos para la producción de biocombustibles y bioproductos (2015).

³⁴ DORMOND, Herbert, *et al.* Evaluación preliminar de la cáscara de banano como material de ensilaje, en combinación con pasto King Grass (*Pennisetum purpureum*). En: Revista electrónica de las sedes regionales de la universidad de Costa Rica. Septiembre, 2011. 18 p. ISSN 2215-2458.

³⁵ *Ibid.* p.19

³⁶ GUARNIZO, Anderson, MARTINEZ, Pedro. y VALENCIA, Hoover. Pretratamientos de la celulosa y biomasa para la sacarificación. En: Revista Scientia et Technica. Agosto, 2009. p. 284-289.

³⁷ CANO, Natalia, *et al.* Biomasa lignocelulósica en Colombia, pretratamiento y productos de valor agregado. En: PIÑEROS, Y.; Aprovechamiento de biomasa lignocelulósica, algunas experiencias de investigación en Colombia. Bogotá: Universidad Jorge Tadeo Lozano, 2014. 7-56 p.

³⁸ EL-DIN, Alaa, *et al.* Study on the use of banana peels for oil spill removal. En: Alexandria Engineering Journal. Mayo, 2017. p. 1-8

Como se puede apreciar, las microfibrillas de celulosa cubiertas por las capas de hemicelulosa y lignina constituyen la pared celular de las células estructurales de la cáscara³⁹. La principal función del material lignocelulósico se basa en hacer parte las células estructurales dándole mayor rigidez a la cáscara, también proporciona una mejor resistencia mecánica y la protege de organismos patógenos⁴⁰. Para el aprovechamiento de la cáscara de banano, como biomasa residual, es de gran importancia tener presente que la lignina, siendo la capa más compleja del material lignocelulósico, actúa como una barrera que protege los carbohidratos que constituyen el material homocelulósico, haciendo más compleja la degradación del fruto⁴¹. Es por lo anterior que es necesario realizar pretratamientos a la biomasa para romper el material lignocelulósico y aprovechar los carbohidratos que involucra la cáscara de banano⁴². Los pretratamientos aumentan el área de superficie específica de la biomasa provocando el rompimiento de la lignina, disminuyen el grado de cristalinidad de la celulosa y facilita la degradación de la biomasa^{43,44,45}.

1.3 BIOHIDRÓGENO COMO COMBUSTIBLE

La producción de hidrógeno se ha convertido en un tema de relevancia dentro del campo de las energías alternativas⁴⁶. Lo anterior se debe a que el hidrógeno es considerado como uno de los mejores candidatos para reemplazar los combustibles fósiles⁴⁷. El poder calorífico inferior del hidrógeno es 122 kJ/g, el cual es 2.75 veces mayor que el de los combustibles hidrocarburos⁴⁸. Además se destaca por el nulo

³⁹ ROMERO, Hugo, AYALA, Humberto, LAPO, Byron. Efecto de tres-tratamientos de cáscara de banano para la obtención de jarabe glucosado mediante hidrólisis enzimática. En: Revista Avances en Química. Abril, 2015. vol.10, no.1. p.79-82.

⁴⁰, Silvia, Op. cit. p. 19.

⁴¹SILVA, Viviane. Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos para la producción de biocombustibles y bioproductos. Tesis doctoral. Valladolid: Universidad de Valladolid. Escuela técnica superior de ingenierías agrarias. Septiembre, 2015. p. 2

⁴² ROMERO, Hugo. Op. Cit., p. 80.

⁴³ SILVA. Op., cit., página 20

⁴⁴TAHERZADEH, Mohammad y KAREMI, Keikhorso. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. En: International Journal of Molecular Sciences. Septiembre, 2008. p. 1621-1651.

⁴⁵NIÑO, Lilibeth; ACOSTA, Alejandro y GELVES, Ricardo. Evaluation de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática e residuos lignocelulósicos de uca (*Manihot esculenta Crantz*). En: Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquía. Diciembre, 2013. p. 317-326.

⁴⁶ KANCHANASUTA, Suwimon; *et al.* Stability of *Clostridium butyricum* in biohydrogen production from non-sterile food waste. En: International journal of hydrogen energy. Febrero, 2017. vol. 42. no. 5. p. 3454-3465.

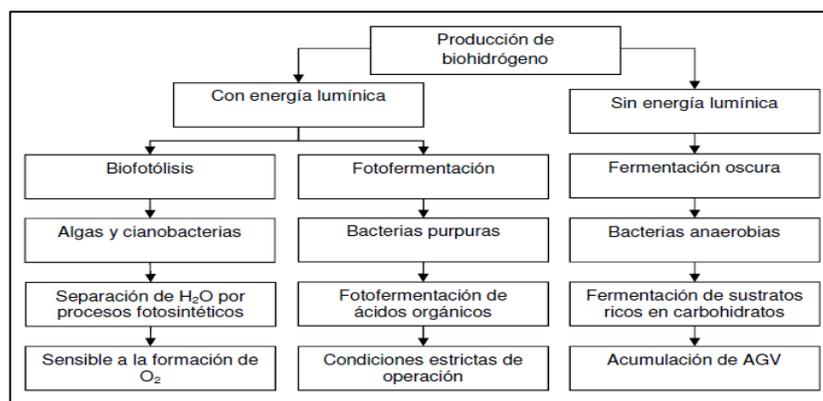
⁴⁷ SEPPALA, Jenni; *et al.* Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* and *Escherichia coli* in pure and cocultures. En: International journal of hydrogen energy. Julio, 2011. vol. 36. p. 10701-107008.

⁴⁸CLASSEN, P. *et al.* Utilization of biomass for the supply of energy carriers. En: Applied Microbiol Biotechnol. Agosto, 1999. p. 741-755.

impacto ambiental que causa durante la combustión⁴⁹ puesto que solo genera agua como subproducto⁵⁰.

El hidrógeno puede ser obtenido por rutas químicas o biológicas. Cuando es obtenido por una ruta biológica se le denomina biohidrógeno⁵¹. Los procesos biológicos comprenden un conjunto de reacciones ya sean paralelas y/o simultáneas por acción de enzimas que hacen parte de bacterias fotosintéticas o fermentativas⁵². En la figura 2 se muestran las vías biológicas para la producción de biohidrógeno.

Figura 2. Producción de biohidrógeno por vías biológicas.



Fuente: BLANCO, S., Producción de biohidrógeno a través de fermentación oscura de residuos (2013).

En la figura 2 se observan los diferentes procesos biológicos para la obtención de hidrógeno donde se especifica el tipo de fermentación, bacteria, y metabolitos principales producidos a parte del biohidrógeno. En este proyecto, la vía a ejecutar es la fermentación oscura que presenta las características generales que se observan en la figura mediante la fermentación oscura con bacterias *spp. Clostridium*, con un sustrato rico en carbohidrato como la cáscara de banano.

1.3.1 Fermentación oscura. La fermentación oscura es un proceso biológico que se realiza en ausencia de energía lumínica, en la cual las reacciones metabólicas de bacterias estrictamente anaerobias o anaerobias facultativas transforman la

⁴⁹BLANCO, Sergio. Op, cit, página 13.

⁵⁰BEDOYA, Andrea. et al. Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. En: Revista DYNA. Noviembre, 2008, vol 75. no.154, p. 137-157.

⁵¹ ALFONSO, Freddy, et al. Evaluación de la producción de hidrógeno usando la bacteria *clostridium butyricum* en un reactor tipo cstr a escala laboratorio. En: Revista de investigación Universidad de América. Marzo, 2013. vol. 6. no. 1, p.19-37

⁵²MONTOYA, Dolly. Anaerobic, solvent-producing bacteria: Molecular characterisation, polysaccharolytic activity and agroindustrial waste degradation. Tesis de doctorado. Alemania: Universidad de Múnich; 2003. p. 41.

materia orgánica rica en carbohidratos, ácidos y alcoholes liberando hidrógeno^{53,54}. El proceso fermentativo puede realizarse a diferentes temperaturas⁵⁵ y además implica la participación de un sin número de especies bacterianas que producen diferentes metabolitos, que en conjunto reciben el nombre de biogás el cual se compone principalmente de metano, hidrógeno y dióxido de carbono⁵⁶. La formación de biogás sucede durante las etapas de la digestión anaerobia y su composición final está dada por los microorganismos que participan en ella. Por tanto, la producción de hidrógeno durante el proceso biológico se consigue si existen la participación de microorganismos que puedan producirlo durante su metabolismo. Las especies bacterianas más estudiadas para producir hidrógeno son las que clasifican dentro de los géneros *Clostridium*, *Enterobacter* y *Bacillus*^{57,58,59,60} las cuales también son consideradas como bacterias acidogénicas.

1.4 MICROORGANISMO: GÉNERO *Clostridium*

Clostridium spp. es un género de microorganismos de gran estudio, se ha encontrado la existencia de 177 especies pertenecientes al género⁶¹. Se caracterizan por ser bacterias heterótrofas, con morfología cilíndrica o bacilos y además son bacterias formadoras de esporas⁶² de tipo Gram positivas⁶³. Son bacterias estrictamente anaerobias, es decir, que poseen un metabolismo que le permite su supervivencia en ambientes que carecen de oxígeno⁶⁴.

⁵³ NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G. y LYBERATOS, G. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review. En: Waste and biomass valoration. 2010. vol. 1, no. 1. p. 21-39.

⁵⁴ BLANCO, Sergio. Op, cit, página 16.

⁵⁵ BEDOYA, Andrea. *et al.* Op, cit, página 143.

⁵⁶ DÍAZ, María; ESPITIA, Sandra; MOLINA, Francisco. Digestión anaerobia una aproximación a la tecnología. Bogotá D.C. Instituto de biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Primera edición. 2002. Página 41.

⁵⁷ SINHA, P. Op, cit, página 7462.

⁵⁸ LAXMAN, Vinayak, *et al.* Surfactant mediated enhanced glycerol uptake and hydrogen production from biodiesel waste using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. En: Renewable Energy. Marzo, 2016. vol. 95. p. 542-551.

⁵⁹ BECKERS, L. *et al.* Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 and *Citrobacter Freundii* CWBI952 in pure and mixed cultures. En: Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 2010. p. 541-548.

⁶⁰ BEDOYA, Andrea. *et al.* Op, cit, página 143

⁶¹ JULON, Withman; MEJÍA, Jorge. Género *Clostridium*. [Citado 22 de agosto de 2018] Disponible en: <<https://es.scribd.com/doc/66189334/Clostridium>>

⁶² CASSIR, Nadim; BENAMAR, Samia y LA SCOLA Bernard. *Clostridium butyricum*: from beneficial to a new emerging pathogen. En: Clinical microbiology and infection. Octubre, 2015. p. 3-8

⁶³ WIEDMANN, Martin; ZHANG, Wei. Genomics of foodborne bacterial pathogens. 2011. p. 96. ISBN: 978-1-4419-7685-7.

⁶⁴ JULON, Withman, Op. cit. p. 3

Clostridium spp. se localiza en el agua, el suelo y en aguas residuales, también se encuentra formando parte de la flora intestinal, en el tubo digestivo de animales y del hombre⁶⁵, inclusive han sido encontradas en el aparato genital de la mujer y hay estudios donde se ha logrado su aislamiento de la boca y la piel del hombre⁶⁶. Muchas de las especies que pertenecen a este género son patógenas⁶⁷, dado que son microorganismos que pueden producir muchas enfermedades al hombre debido a su capacidad de sobrevivir a muchas condiciones ambientales por su capacidad de formar esporas, a la síntesis excesiva de toxinas enterotoxinas, neurotoxinas e histolíticas y a su rápido crecimiento en ambientes sin presencia de oxígeno⁶⁸.

En cuanto al proceso fermentativo de estas bacterias transcurre en dos etapas, sin embargo previo al desarrollo de estas, ocurre la degradación de la biomasa en moléculas más simples donde las bacterias participantes excretan enzimas (hidrolasas) para efectuar la degradación y de esta manera poder comenzar el proceso de fermentación (hidrólisis enzimática)⁶⁹. Las etapas que se desarrollan durante la fermentación son: la **acidogénesis**, durante esta primera etapa las moléculas pequeñas como lípidos, aminoácidos y azúcares simples obtenidos en la hidrólisis enzimática atraviesan la membrana celular de las bacterias para ser fermentadas anaeróbicamente de manera que el crecimiento de los microorganismos sucede de forma acelerada, los productos de la acidificación son principalmente ácido butírico o ácido acético⁷⁰ algunos ácidos grasos, dióxido de carbono e hidrógeno⁷¹ y la **solventogénesis** es la segunda etapa, aquí se fomenta la producción de solventes tales como butanol acetona y etanol, esta última en menor proporción que las primeras y la obtención de estos metabolitos promueven la acidificación del medio⁷².

Clostridium butyricum es una bacteria anaerobia⁷³; esta especie presenta colonias de color blanco con bordes irregularmente cremosos⁷⁴ y la síntesis de esporas está

⁶⁵ Ibid.p.3

⁶⁶ GARCÍA, José. Clostridium. En: PUMAROLA, A., RODRÍGUEZ, A., GARCÍA, J. y PIÉDROLA, G.. Microbiología y parasitología médica. 2 ed. Madrid: Salvat, 2005. p. 387-401.

⁶⁷ CASSIR, Nadim, Op. cit. p. 3

⁶⁸ JULON, Withman, Op. cit. p. 3

⁶⁹ MINISTERIO DE ENERGÍA, op, cit, Página 25.

⁷⁰ MATHEWS, J. & WANG, G. (2009). Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy, 34,7404-7416.

⁷¹ LONDOÑO, S. y RODRÍGUEZ, T. Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura: una revisión crítica (1993-2011). En: Revista chilena de ingeniería. 2012. vol. 20, no. 3. p. 398-411.

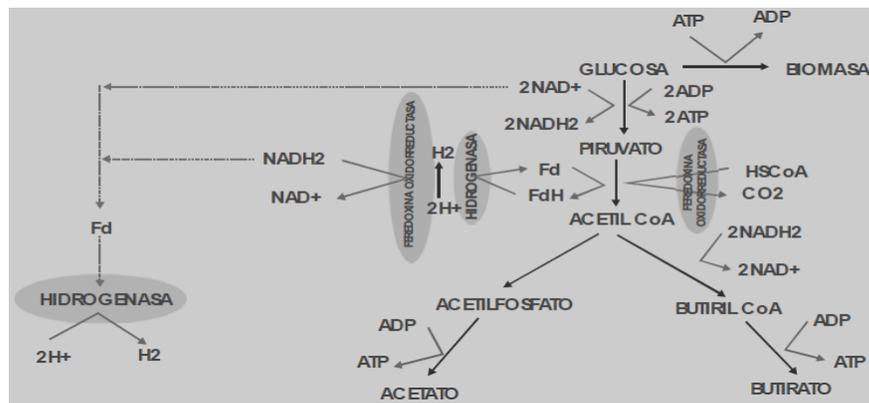
⁷² DÜRRE, P. (2008). Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. Annals of the New York Academy of Sciences, 1125, 353-62.

⁷³ CASSIR, Nadim; BENAMAR, Samia y LA SCOLA Bernard. *Clostridium butyricum*: from beneficial to a new emerging pathogen. En: Clinical microbiology and infection. Octubre, 2015. doi: 10.1016/j.cmi.2015.10.014. p. 3-8

⁷⁴ ALFONSO, Freddy. *et al.* Op, cit, página 21.

dada en el extremo sub-terminal del bacilo⁷⁵, su método de obtención de energía es mediante la fosforilación de carbohidratos, es decir, un sustrato adecuado para su metabolismo debe contener carbono, nitrógeno, hidrógeno, oxígeno, y azufre⁷⁶. Durante el proceso fermentativo del *C. butyricum* se ha reportado la producción de acetato, hidrógeno, dióxido de carbono y principalmente de ácido butírico (en mayor cantidad)⁷⁷ obteniendo rendimientos de hasta 2 mol de H₂ por mol de sustrato, siendo este glucosa⁷⁸.

Figura 3. Ruta metabólica del hidrógeno en *C. butyricum*.



Fuente: BEDOYA, Andrea. et al. Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte (2008).

En la ruta metabólica de *C. butyricum* ilustrada en la figura 3 se observa cuando la glucosa se convierte en piruvato, por acción de la enzima piruvato ferredoxi-oxidorreductasa, se obtiene dióxido de carbono e hidrógeno. Una porción de los electrones se transfiere a protones para obtener el hidrógeno y el restante a NAD⁺ para obtener NADH₂, gracias a la acción de la hidrogenasa, el NADH₂ generado y el NADH₂ producido durante la glucólisis reaccionan también para producir hidrógeno. El piruvato por acción de la coenzima acetil –CoA sufre la descarboxilación oxidativa donde metaboliza hidrógeno, ATP y butirato principalmente, así como otros subproductos como lo son el etanol y el acetato^{79,80}. El análisis estequiométrico realizado a partir de la figura 3 por BEDOYA, Andrea. et

⁷⁵ GARCÍA, José. Clostridium. En: PUMAROLA, A., RODRÍGUEZ, A., GARCÍA, J. y PIÉDROLA, G.. Microbiología y parasitología médica. 2 ed. Madrid: Salvat, 2005. p. 47-55.

⁷⁶ ALFONSO, Freddy. et al. Op, cit, página 21.

⁷⁷ BEDOYA, Andrea. et al. Op, cit, página 143.

⁷⁸ NTAIKOU, I.; Op, cit, página 22.

⁷⁹ BLANCO, Sergio. Op, cit, página 19.

⁸⁰ ALFONSO, Freddy. et al. Op, cit, página 21

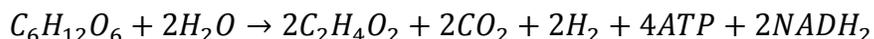
a/ ⁸¹ donde se representan las ecuaciones correspondientes a la formación de biomasa (ecuación 1), acetato (ecuación 2) y butirato (ecuación 3).

Ecuación 1. Formación de biomasa.



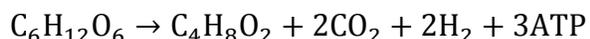
Fuente: CHEN, W-M., et al. P. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge (2005).

Ecuación 2. Formación de acetato.



Fuente: CHEN, W-M., et al. P. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge (2005).

Ecuación 3. Formación de butirato.



Fuente: CHEN, W-M., et al. P. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge (2005).

La producción de estos metabolitos se debe realizar en ausencia de oxígeno; pues los microorganismos requieren una mayor cantidad de energía que es obtenida por medio de los azúcares⁸². En consecuencia, si se quiere utilizar cualquier tipo de biomasa residual como sustrato, es necesario que este residuo cuente con el contenido orgánico apropiado para permitir el crecimiento microbiano en el medio anaeróbico⁸³. En los procesos de fermentación para la producción de hidrógeno, la cantidad de hidrógeno obtenido se cuantifica con respecto al rendimiento (cantidad de mol H₂ por mol de sustrato consumido) y la tasa de producción de hidrógeno (cantidad de H₂ en ml por unidad de tiempo y unidad de volumen del reactor o unidad de biomasa)⁸⁴. El rendimiento de hidrógeno reportado para la *C. butyricum* oscila

⁸¹ BEDOYA, Andrea. et al. Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. En: Revista *DYNA*. Noviembre, 2008, vol 75. no.154, p. 137-157.

⁸² HERNÁNDEZ, Alicia. Op. cit. p. 39.

⁸³ MINISTERIO DE ENERGÍA, op, cit, Página 28.

⁸⁴ ARGUN, H. y KARGI, F. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: an overview. En: International journal of hydrogen energy. Julio, 2011. vol. 36, no. 13. p. 7443-7459.

entre 0.23 y 3.47 (mol H₂/mol hexosa), según el tipo de sustrato al que es expuesto; exponiendo sus mayores rendimientos a la glucosa y a pH neutros⁸⁵.

1.4.1 Factores de crecimiento. Para el óptimo desarrollo del *Clostridium butyricum* es necesario tener presente que los factores tales como la temperatura, pH y sustrato se encuentren en condiciones óptimas de crecimiento, es decir, que dichos factores deben proporcionar a los microorganismos las condiciones adecuadas que les permita subsistir en un medio determinado y de esta manera promover el crecimiento y la reproducción microbiana. Entonces, se hace necesario el conocimiento de los rangos óptimos en que crecen las bacterias, ya que no todas requieren las mismas condiciones para su reproducción, es por ello que las condiciones óptimas vitales que influyen en el comportamiento del *Clostridium butyricum* pueden ser o no similares a las de otras bacterias e inclusive a otras del mismo género. A continuación, se mencionan aquellos factores principales que influyen en el comportamiento microbiano y específicamente en el comportamiento del *C. butyricum*:

- **Temperatura:** es uno de los parámetros que tiene mayor importancia ya que de este depende el crecimiento bacteriano, sus rutas metabólicas y la capacidad de las bacterias para la degradación del sustrato⁸⁶. Se considera que entre mayor sea la temperatura mayor será la velocidad de crecimiento microbiano, controlando que la temperatura no exceda la óptima del microorganismo⁸⁷. *Clostridium butyricum* se caracteriza por ser microorganismos mesofílicos por lo que el rango de temperatura en que se desarrollan comprende entre 15°C - 45°C ⁸⁸ siendo 37° C la temperatura óptima de crecimiento⁸⁹.
- **pH:** es un factor que mide la alcalinidad o la acidez del medio. El efecto del pH se manifiesta en la capacidad que tiene la bacteria para asimilar el medio⁹⁰. Para procesos de digestión anaeróbica el pH de trabajo debe ser neutro (7). En el caso de las *C. butyricum* la finalización de la fase

⁸⁵ YIN, Yanan y WANG, Jianlong. Isolation and characterization of a novel strain *Clostridium butyricum* INET1 for fermentative hydrogen production. En: International journal of hydrogen energy. Marzo, 2017. vol. 42. p. 12173-12180.

⁸⁶ WANG, Mei-Yun; *et al.* Monitoring dark hydrogen fermentation performance of indigenous *Clostridium butyricum* by hydrogenase gene expression using RT-PCR and qPCR. En: International journal of hydrogen energy. Septiembre, 2008. vol. 33. no. 18. p. 4730-4738.

⁸⁷ MINENERGIA; PNUD; FAO y GEF. Factores determinantes en el proceso metanogénico (producción de biogás). En: Manual del biogás. Santiago de Chile, 2011. p. 38-40

⁸⁸ MINISTERIO DE ENERGÍA. Manual del biogás. Proyecto CHI/00/G32, Chile: Remoción de barreras para la electrificación rural con energías renovables. 2011. p.39.

⁸⁹ HOUSAGUL, Op. Cit., p. 2219 – 2223.

⁹⁰ VAN GINKEL, Steven y SUNG, Shihwu. Biohydrogen Production as a Function of pH and Substrate Concentration. En: Environmental Science & Technology. Noviembre, 2001. vol.35, no. 24, p. 4726-4730.

exponencial y el inicio de la fase estacionaria se relaciona directamente con la formación de subproductos (ácido butírico) producidos durante la reproducción celular causando así la disminución de pH en el medio y por ende la inhibición del crecimiento bacteriano (aproximadamente a 4.5)⁹¹, sin embargo según varios estudios realizados esta especie soporta pH bajos que comprende valores entre 5.5 y 6.5⁹², inclusive a pH de 6.5 han logrado obtener altos rendimientos de hidrógeno.

- **Sustrato:** el sustrato es la fuente de carbono que necesitan las bacterias para realizar sus procesos metabólicos. Durante la etapa exponencial o crecimiento las bacterias al adaptarse al medio comienzan a reproducirse por medio de la división celular, por lo tanto, comienza un crecimiento exponencial de la población bacteriana al tiempo que disminuye la fuente de carbón. Este crecimiento logarítmico muestra un comportamiento directamente proporcional entre el crecimiento poblacional por unidad de tiempo hasta que los nutrientes proporcionados en el medio se agotan. Para *Clostridium butyricum* esta fase puede durar entre 7.5 y 18 horas, según la cantidad de nutrientes proporcionados^{93,94}. Los carbohidratos, las proteínas y los lípidos son macromoléculas que hacen parte de cualquier tipo de sustrato⁹⁵, su degradación permite obtener aminoácidos, ácidos grasos y azúcares mucho más simples que son utilizados como fuente de carbono⁹⁶, el principal responsable del comportamiento en cuanto al crecimiento microbiano. La descomposición de biomasa residual por parte de los microorganismos complejos es un proceso más difícil de realizar debido al contenido de carbohidratos complejos, por lo que este tipo de sustratos deben ser sometidos a un tratamiento previo⁹⁷.
- **Nutrientes:** para el adecuado crecimiento y reproducción de los microorganismos es necesario la presencia de compuestos que cubran sus necesidades metabólicas, por tanto, es indispensable que el medio de cultivo cuente con agua, energía, nitrógeno, minerales y vitaminas. *C. butyricum* es un microorganismo orgánotrofo y heterótrofo, por lo que obtiene su energía

⁹¹ KANCHANASUTA, Suwimon; *et al.* Stability of *Clostridium butyricum* in biohydrogen production from non-sterile food waste. En: International journal of hydrogen energy. Febrero, 2017. vol. 42. no. 5. p. 3454-3465.

⁹² KANCHANASUTA, Suwimon; *et al.* Op. cit. p. 3460.

⁹³ SEPPALA, Jenni; *et al.* Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* and *Escherichia coli* in pure and cocultures. En: International journal of hydrogen energy. Julio, 2011. vol. 36. p. 10701-10708

⁹⁴ MALAGÓN, Dionisio. *et al.* Op. cit. p. 3

⁹⁵ MINISTERIO DE ENERGÍA, op, cit, Página 20.

⁹⁶ *Ibid.*, p. 20

⁹⁷ ALFONSO, Freddy. *et al.* Op, cit, página 21.

por medio de compuestos orgánicos⁹⁸, además es necesario que exista la presencia de fosfatos y metales como el hierro, sodio y zinc⁹⁹. Los nutrientes comúnmente adicionados a los medios de cultivo para *Clostridium* son: extracto de levadura, K₂HPO₄, KHPO₄, FeSO₄.7H₂O y la cisteína que funciona como un agente reductor¹⁰⁰, otro de los factores que determinan los nutrientes a adicionar es la proporción carbono- nitrógeno (C/N), que según varios estudios realizados debe estar en el rango de 20-30 ^{101,102}, este parámetro indica las unidades de carbono por unidad de nitrógeno necesarias para las bacterias, un valor bajo de este parámetro podría causar la inhibición de la actividad bacteriana debido a la gran cantidad de amonio que se acumularía por la excesiva formación de nitrógeno¹⁰³. Algunos casos como los medios de cultivo complejos, los cuales son aquellos que se realizan con ingredientes de origen natural y que no cuentan con una composición conocida, son medios que necesita suplementos de acuerdo a las necesidades del microorganismo¹⁰⁴. Desde una perspectiva industrial, inicialmente se realiza un medio de cultivo sintético para conocer los requerimientos nutritivos del microorganismo para después adaptarlo a un medio complejo que cumpla con dichas necesidades¹⁰⁵.

Un medio estandarizado para el crecimiento de *Clostridium* es el RCM (medio de cultivo de *Clostridium* reforzado), este cuenta con los nutrientes necesarios para la activación de las cepas, permite el crecimiento de la carga bacteriana a partir de inóculos pequeños para luego realizar la fermentación además si se trabaja con una cepa de bacterias ya activas, el tiempo de latencia será corto o prácticamente nulo¹⁰⁶; su composición consta de almidón para beneficiar la germinación de esporas, la glucosa cumple el papel de proporcionarle energía, la cisteína es un agente reductor y en cuanto a la peptona, extracto de carne y levadura, le proporcionan la proteína y nutrición al medio y el cloruro de sodio controla el equilibrio osmótico¹⁰⁷.

⁹⁸ HERNÁNDEZ, Alicia. El mantenimiento de los microorganismos. En: Microbiología industrial. Editorial estatal a distancia. p. 22.

⁹⁹ Ibid., p. 23-24

¹⁰⁰ ALFONSO, Freddy, *et al.* Op. cit. p. 26

¹⁰¹ ANZOLA, Melida, *et al.* The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. En: Biotechnology Reports. Noviembre, 2014. vol. 5. p. 46-54

¹⁰² WANG, Ming. Op. cit. p. 1

¹⁰³ MINISTERIO DE ENERGÍA, op, cit, Página 35.

¹⁰⁴ HERNÁNDEZ, Alicia. Op. cit. p. 25

¹⁰⁵ Ibid., p. 26

¹⁰⁶ CULTIMED. Manual básico de microbiología. 2013. [Citado 28 de agosto de 2018] Disponible en:< <http://www.ictsl.net/mobile/pda/downloads/microbiologia.pdf>>

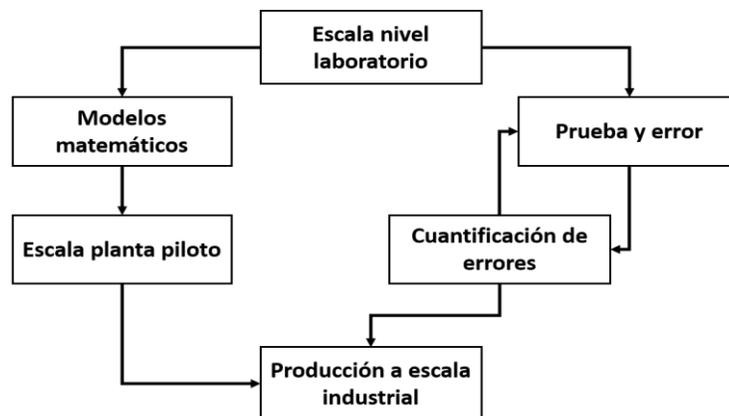
¹⁰⁷ Ibid., p. VI

- **Inóculo:** el inóculo tiene como finalidad el desarrollo de una población hasta que sea viable y produzca los metabolitos deseados. Se puede realizar de tres maneras: utilizando un cultivo puro, mixto o de ambos, estos dos últimos afectan directamente la producción del hidrógeno ya que puede que exista la presencia de bacterias consumidoras del H₂ para el proceso de digestión anaeróbica, es por ello, que los cultivos deben someterse a un pretratamiento para inactivar estas consumidoras. En algunos casos industriales, se realiza un pre-inóculo para activar las bacterias y posteriormente un inóculo en el cual las bacterias se adapten al medio requerido por el tipo de industria. La cantidad de inóculo generalmente para el proceso es del 10% del volumen total del medio¹⁰⁸.

1.5 ESCALAMIENTO

El escalamiento de un proceso es de gran importancia el correcto dimensionamiento de los equipos involucrados, así como las proporciones de los compuestos necesarios a utilizar. En un escalamiento para procesos bioquímicos, estos aspectos son relevantes dado que las reacciones metabólicas y aquellas que suceden durante el proceso dependen de estos¹⁰⁹. En la figura 4, se observa una generalización de los pasos para proceder a realizar un escalamiento.

Figura 4. Pasos para escalamiento a nivel industrial.



Fuente: ANAYA, Alejandro y PEDROZA, Humberto. Plantas piloto, el paso entre el huevo y la gallina (2008).

Muchos de los procesos industriales son primero evaluados a escala laboratorio o piloto, donde se establecen los mejores parámetros para el desarrollo del proceso,

¹⁰⁸ Ibid., p. 28.

¹⁰⁹ RUIZ, Ángela. Factores de escala para la producción biotecnológica de etanol carburante. Tesis para título de doctorado en ingeniería. Medellín: Universidad nacional de Colombia. 2009. 21 p.

debido a que estos son de menor proporción que las etapas posteriores. Luego de esto y con el fin de una mejor comercialización del producto¹¹⁰, dichos parámetros se tienen que adecuar a un tamaño mayor conservando condiciones de similitud. Existen varios modelos de escalamiento que se pueden adaptar según el tipo de proceso que se desea escalar, entre los que se encuentran:

- **Método basado en modelos:** se basa en razonamientos teóricos que brindan una aproximación al proceso por medio de modelamientos. Para ello se debe tener un completo conocimiento y entendimiento del proceso que permita un escalado exitoso. Si se logra realizar un análisis matemático que se ajuste fielmente al modelo, se considera mejor que otros métodos de escalamiento^{111,112}.
- **Método empírico:** se postula sin bases teóricas propias del proceso, es decir, se puede basar en datos obtenidos en escalamientos anteriores realizando correlaciones empíricas, no se toman en cuenta todos los factores influyentes en el proceso, y es por esto que los rendimientos obtenidos no coinciden con los calculados teóricamente^{113,114}.
- **Método de similitud:** este modelo se fundamenta en realizar un análisis de similaridad entre los procesos, esto por medio de agrupaciones de constantes características del proceso cuya semejanza reduzca la cantidad de variables a tener en cuenta. Las similitudes que más se trabajan en proceso de escalamiento en ingeniería química son: similitud geométrica, cinemática, dinámica, térmica y química¹¹⁵. En general la idea de este método se puede resumir en “Si dos sistemas están descritos con las mismas ecuaciones diferenciales, con las mismas ecuaciones de contorno y con los mismos parámetros de operación, entonces ambos sistemas se deben comportar de manera idéntica”¹¹⁶.

En el caso de procesos bioquímicos el método de escalamiento que más se suele usar es el de similitud¹¹⁷. Para realizar un buen escalado de este tipo de procesos

¹¹⁰ ANAYA, Alejandro y PEDROZA, Humberto. Plantas piloto, el paso entre el huevo y la gallina. En: Tecnología, ciencia y educación. Enero-Julio 2008. vol. 23, no. 1, p. 31-39.

¹¹¹MUÑOZ, Eduardo. escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con células permeabilizadas de *Candida apícola*. Tesis para obtener grado de académico. Jalisco: centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco. 2016. 26 p.

¹¹² RUIZ, Op. Cit., p. 20.

¹¹³ ANAYA, Op. Cit., p. 34.

¹¹⁴ MUÑOZ, Op. Cit., p. 26.

¹¹⁵ ANAYA, Op. Cit., p. 34.

¹¹⁶ RUIZ, Op. Cit., p. 19-20.

¹¹⁷ Ibid., p. 21.

es necesario comprender el metabolismo de los microorganismos, al igual que el efecto del sustrato en la reacción¹¹⁸. En la tabla 1 se muestran algunos de los fenómenos más importantes en el escalado de bioprocesos.

Tabla 1. Fenómenos de importancia para el escalado en bioprocesos.

VARIABLE QUE SE VA A ESCALAR	PROCESO	CRITERIO DE ESCALADO
Velocidad de agitación	Cultivo de células animales	ϵT (velocidad de disipación de energía), velocidad de la punta del impulsor. La semejanza geométrica no se puede mantener.
Velocidad de aireación	Procesos aireados	Volumen de aire por Volumen de Medio (VVM).
Geometría	Procesos sumergidos	Semejanza geométrica, excepto para el cociente altura-diámetro del biorreactor (H/D), número de agitadores los cuales incrementan.

Fuente: RUIZ, Ángela. Factores de escala para la producción biotecnológica de etanol carburante (2009).

Los microorganismos podrían llegar a presentar cambios en su condición hidrodinámica dependiendo de su tamaño. En el caso de las bacterias, no presentan cambios debido a su tamaño ya que al ser tan pequeñas el estrés dinámico del fluido no las afecta¹¹⁹. Otra de las propiedades que pueden ser afectada es la viscosidad del medio dependiendo el tipo de microorganismo empleado, por esto la viscosidad es una variable que hay que controlar debido a que se evidencia la dificultad de la transferencia de masa y energía gracias a ella, por lo tanto, se puede analizar el efecto de gradientes de oxígeno y de concentración. Los cambios más agresivos que experimentan los microorganismos son factores ambientales como largos tiempos de mezclado¹²⁰.

Los procesos químicos y bioquímicos deben ser evaluados en primera instancia a una escala pequeña: la escala laboratorio. Una vez evaluados los procesos a esta escala, el mismo es luego llevado a escala industrial; pero dado que estos procesos son tan complejos es necesario que haya escalas intermedias que permitan

¹¹⁸ ARDILA, Kathy y VILORIA, Andrés. Evaluación del escalamiento de la producción de polihidroxialcanoatos (pha) por fermentación a partir de la bacteria mutante *Burkholderia cepacia* B27 a nivel semi-industrial. Trabajo de grado para optar título de ingeniería química. Bogotá D.C.: Fundación Universidad de América. 2017. p. 25.

¹¹⁹ RUIZ, Op. Cit., p. 22.

¹²⁰ Ibid., p. 22.

observar el comportamiento del proceso al ir adicionando más tecnología en los equipos y un mayor tamaño de estos, tal es el caso de la escala piloto y banco. La escala banco es la etapa de escalamiento siguiente a la escala laboratorio. En esta etapa se encuentran equipos con mayor tamaño y cuenta además con más tecnología¹²¹, por lo que los datos obtenidos allí son más confiables para realizar la siguiente etapa de escalamiento y estar más cerca al requerimiento industrial. Los beneficios de esta escala son el bajo costo del proceso, a comparación de escala piloto, además de que es posible rectificar los datos o el comportamiento del proceso que fueron obtenidos a escala laboratorio¹²².

La producción de hidrógeno resulta ser entonces una alternativa sumamente atractiva como sustituto de los combustibles fósiles; y para su obtención, es posible el aprovechamiento de la cáscara de banano, por medio de la ruta metabólica de *Clostridium butyricum*. En los siguientes capítulos se expone la metodología y los resultados obtenidos para la evaluación de la producción de hidrógeno mediante el planteamiento que ha sido previamente expuesto.

¹²¹ PÉREZ, Francisco. Escalado de una torre de absorción. Trabajo de grado ingeniería química. Sevilla: Universidad de Sevilla. Escuela técnica superior de ingeniería. 2016. p. 4-5.

¹²² Ibid., p. 4-5.

2. ESTABLECIMIENTO DE LOS PARÁMETROS PARA LA FERMENTACIÓN DE LA CÁSCARA DE BANANO A ESCALA LABORATORIO

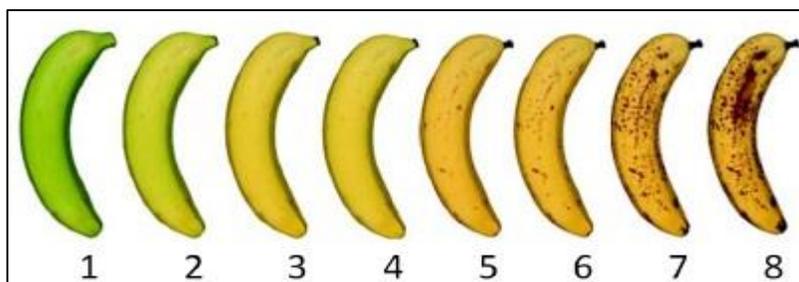
El presente proyecto se desarrolló de forma experimental con fines netamente investigativos. Para llevar a cabo el proceso fermentativo a escala laboratorio es necesario tener una caracterización y adecuación previa de la biomasa residual con el fin de facilitar la degradación del material orgánico por las bacterias metabólicas que protagonizarán el proceso biológico. Se determinó la composición de los gases resultantes de los medios de cultivos dependiendo de la variación de sustrato en cada medio y se seleccionó la mejor alternativa para el escalamiento. La experimentación de este primer objetivo se realizó en los espacios de laboratorio proporcionados por la Universidad ECCI, la Fundación Universidad de América, donde se realizó la molienda de la cáscara y en la Universidad Nacional en el Instituto de Biotecnología (IBUN) donde se llevaron a cabo las cromatografías.

2.1 MÉTODOS

A continuación, se describen los procesos y materiales que se llevaron a cabo durante el primer objetivo desarrollado.

2.1.1 Recolección de la cáscara. Las cáscaras recolectadas fueron de la especie de banano *Musa cavendish*. Su recolección se efectuó en una frutería ubicada en el barrio Castilla de la ciudad de Bogotá D.C. llamada Tropical frutería – heladería. Las cáscaras fueron recolectadas días antes a la experimentación para que estén en las condiciones más frescas posibles debido a que el proceso de maduración de las cáscaras es muy acelerado. Las cáscaras fueron seleccionadas con respecto al índice de color de la escala comercial de la cáscara de banano. Este se presenta en la figura 5 indicando el grado de maduración de la cáscara con respecto al color.

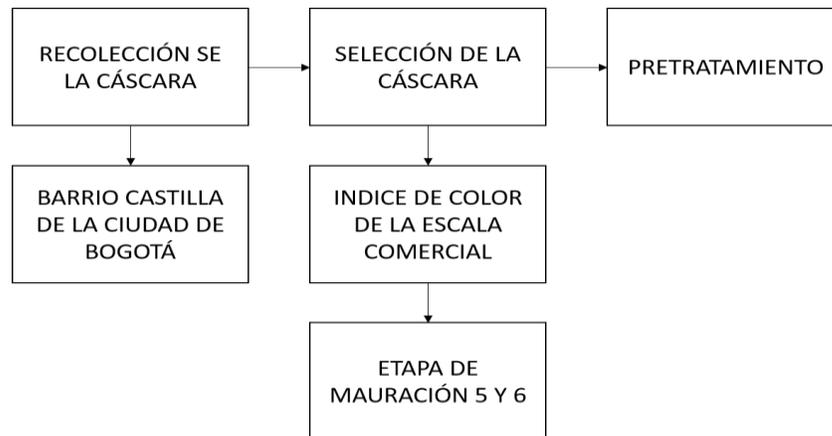
Figura 5. Índice de color de la escala comercial de la cáscara de banano.



Fuente: ESCALANTE, Pilar. Optimización de la extracción enzimática de jugo de banano a partir de los cultivares enano gigante, FHIA-17 y FHIA-23 (2013).

Para el desarrollo de este proyecto se trabajaron con cáscaras de bananos desde la escala 5, las cuales fueron seleccionadas por medio identificación visual, se seleccionó esta escala puesto que la presencia de azúcares reductores en la fruta aumenta con respecto al estado de maduración de la fruta¹²³. A continuación, en la figura 6 se muestra el diagrama de proceso correspondiente a la recolección de la cáscara.

Figura 6.Diagrama de proceso de la recolección de la cáscara.



Fuente: elaboración propia.

2.1.2 Pretratamiento de la cáscara. Las cáscaras de banano fueron sometidas a varios pretratamientos con el fin de asegurar dos aspectos que sin duda pueden afectar el proceso fermentativo de la biomasa residual. En primera instancia fue necesario garantizar que en el residuo no se contaminara con alguna otra especie microbiana que pudiera haber crecido durante el periodo en que fue almacenada. En segunda instancia, fue preciso para facilitar la liberación de los azúcares fermentables contenidos en el material lignocelulósico de las células los cuales hacen parte de los carbohidratos que componen a la cáscara de banano, y que serán la principal fuente de alimentación de las bacterias.

2.1.2.1 Lavado de las cáscaras. El lavado de las cáscaras se realizó agua destilada, esto con el fin de eliminar los materiales no deseados que se encuentren en la superficie de la cáscara. El lavado se realizó dos veces con agua limpia cada una de ellas.

¹²³ CARTAYA, Nayra, *et al.* Evaluación de eficacia de productos naturales para el control de la pudrición de corona (crown rot) en plátano. Julio, 2011. p. 8.

2.1.2.2 Secado de las cáscaras. Una vez lavadas las cáscaras, estas fueron sometidas a un proceso de secado al aire libre. Este se realizó extendiendo el lote completo de cáscaras previamente pesadas al aire libre durante 7 días según lo descrito por El-Din¹²⁴ a temperatura ambiente (14°C, humedad relativa 80-85%). Finalizado el secado se determinó el peso de las cáscaras, con lo cual se determinó el porcentaje de humedad retirado durante el secado solar, acorde a lo planteado por B.K. Dadzie y J.E. Orchard¹²⁵.

Ecuación 4. Porcentaje de Humedad.

$$\%H = \frac{D - E}{D} \times 100$$

Fuente: DADZIE, B.K. y ORCHARD, J. Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de bananos y plátanos: criterios y métodos (1997).

Donde:

$\%H$ = Porcentaje de humedad.

A = Peso de contenedor vacío.

B = Peso del contenedor con la muestra fresca.

C = Peso de la muestra después del secado

D = Peso fresco de la muestra ($D=B-A$).

E = Peso seco de la muestra ($E=C-A$).

- **Determinación de la humedad de las cáscaras sin moler:** la determinación de humedad de las cáscaras se realizó por medio de un análisis de secado. Para ello se realizó una curva de humedad donde se evaluó la pérdida de humedad con respecto al tiempo. Se colocaron dos muestras de cáscara sin moler previamente pesadas (59,4 g y 58,3 g con un valor de incertidumbre para ambas de 0.5g) a un horno (Binder FD 23) a 103°C. Se registró la masa de cada muestra cada 20 minutos hasta alcanzar peso constante. El porcentaje de humedad proporcionado por la curva fue posible calcularlo a partir de gráfica obtenida.
- **Determinación de la humedad de las cáscaras molidas:** para el cálculo de la humedad en las cáscaras molidas se siguió el procedimiento descrito por B.K. Dadzie et J.E. Orchard¹²⁶, donde primero se registró el peso de un crisol vacío y seguido se le adicionaron 10.017 ± 0.5 g de cáscara de banano para registrar el nuevo peso con el crisol. Las condiciones de secado

¹²⁴ EL-DIN, Alaa, *et al.* Op. Cit., p. 1-8.

¹²⁵ Dadzie, B.K y J.E. Orchard. Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de bananos y plátanos: criterios y métodos. 1997. p. 14

¹²⁶ Dadzie, B.K, et al. Op. cit. p. 14

fueron las mismas anteriormente descritas por un tiempo de 24 horas, luego la muestra fue colocada en un desecador por 1 hora y se registró el nuevo peso obtenido a la hora, una vez sacada la muestra del desecador.

2.1.2.3 Proceso de molienda. Una vez finalizado el secado de la cáscara, la biomasa fue sometida a una trituración mecánica empleando un molino de martillos (propiedad de la Universidad de América) con una malla de 0,5 mm de diámetro de partícula después del secado, este tamaño fue seleccionado con el fin de obtener partículas de este o menor tamaño¹²⁷.

2.1.2.4 Proceso de tamizado. Una vez finalizada la molienda se realizó el tamizado empleando un tamizador (Gilson SS-15) de tipo vaivén o sacudida con las mallas 5, 10, 35, 60, 120 y 230 MESH. La respectiva abertura de las mallas seleccionadas está dadas según la norma ASTM E 11-87¹²⁸ ya estandarizada y se muestran a continuación en la tabla 2. Con las partículas separadas por tamaño menor a 0.5 mm¹²⁹ fue posible realizar un análisis de tamizado que permitió la correcta selección de la fracción de partículas a utilizar consecutivamente al finalizar el tamizado.

Tabla 2. Tamaño de mallas.

No. malla	Abertura (mm)
5	3,965
10	1,982
35	0,496
60	0,248
120	0,124
230	0,062

Fuente: elaboración propia.

Se tuvieron en cuenta las aberturas de las mallas empleadas y el peso del material retenido en cada una de las mallas para la determinación de la fracción másica, empleando las siguientes ecuaciones:

¹²⁷ CHANANCHIDA, Nathoa; UBONRAT, Sirisukpoca y NIPON, Pisutpaisala. Production of hydrogen and methane from banana peel by two phase anaerobic fermentation. *En:* Elsevier. Julio, 2014. vol. 50. p. 702–710.

¹²⁸ Equivalencia internacional de tamices. [Citado 12 de septiembre de 2018] Disponible en: <<https://ucatedraivan.files.wordpress.com/2014/08/equivalencia-internacional-de-tamices.pdf>>

¹²⁹ KANCHANASUTA, Suwimon; *et al.* Op. Cit., p. 3460.

Ecuación 5. Diámetro de partícula.

$$D_{p(\# \text{ malla})} = \frac{\sum Ab}{2}$$

Fuente: MCCABE, Warren. Operaciones unitarias de ingeniería química (1991).

Donde:

D_p = Diámetro de partícula.

malla = Numero de la malla.

$\sum Ab$ = Suma de las aberturas del tamiz actual y el anterior.

Ecuación 6. Fracción másica retenida.

$$X_{(\# \text{ malla})} = \frac{\text{masa retenida en la malla}}{\text{masa total}}$$

Fuente: MCCABE, Warren. Operaciones unitarias de ingeniería química (1991).

Mediante los diámetros de partícula y fracción másica retenida por malla, el diámetro promedio de partícula por malla se estima a partir del diámetro medio de masa empleando la siguiente ecuación:

Ecuación 7. Diámetro medio de masa.

$$D_m = \sum_{i=1}^n X_i D_{pi}$$

Fuente: MCCABE, Warren. Operaciones unitarias de ingeniería química (1991).

Para el análisis de tamizado se calculó el porcentaje de retención parcial (ecuación 8), de retención acumulado (ecuación 9) y pasante acumulado (ecuación 10) que se muestran a continuación para cada una de las mallas, adicionalmente se tomaron los pesos de las muestras retenidas en cada una de las mallas cuya sumatoria debe ser igual a la inicial y solo es aceptable un porcentaje de error del 1%¹³⁰.

¹³⁰ BALLESTEROS, Víctor. Diseño de pozos profundos. Universidad Santo Tomás. Colombia. 2004 p.24.

Ecuación 8. Porcentaje de retención parcial.

$$\% \text{ Retención parcial} = \frac{\text{masa en granos retenido en cada malla}}{\text{Peso de la muestra total}} \times 100$$

Fuente: CRESPO, C. Mecánica de suelos y cimentaciones (2004).

Ecuación 9. Porcentaje de retención acumulado.

$$\% \text{ Retención parcial} = \frac{\text{masa en gramos retenido en cada malla}}{\text{Peso de la muestra total}} \times 100$$

Fuente: CRESPO, C. Mecánica de suelos y cimentaciones (2004).

Ecuación 10. Porcentaje pasante acumulado.

$$\% \text{ Pasante acumulado} = 100 - \% \text{ Retenido acumulado}$$

Fuente: CRESPO, C. Mecánica de suelos y cimentaciones (2004).

- **Análisis por microscopía electrónica de barrido:** por medio de una microscopía electrónica de barrido (SEM), fue posible identificar la morfología de la muestra, estructura y tamaño de partículas y comparar con los resultados obtenidos en el análisis de tamizado realizado. Se analizaron dos muestras de cáscara; una de ellas sin moler y la otra muestra luego de ser sometida a la molienda (polvo).

Las muestras analizadas en el SEM (Phenom Pro Desktop) se trabajaron a 15 KeV y con una magnificencia de $1000 \times^{131}$. Previo a su ingreso al SEM, ambas muestras fueron colocadas en un pin o portamuestras con cinta de carbono adhesiva de tal manera que la muestra no quede fuera de la superficie de la cinta, por lo que fue necesario adecuar el tamaño de las muestras al tamaño de la cinta adhesiva y al pin o portaobjetos (ilustración 1). Para ajustar la muestra de cáscara molida, el exceso de polvo de cáscara fue retirado utilizando un compresor.

¹³¹ CUNHA, R, *et al.* Banana starch nanocomposite with cellulose nanofibers isolated from banana peel by enzymatic treatment: In vitro cytotoxicity assessment. En: Carbohydrate polymers. 2019. vol. 207. p. 169-179.

Ilustración 1. Muestras de cáscara adheridas.



Fuente: elaboración propia

Consecutivamente las muestras fueron recubiertas con oro por medio de un sputter (Cressington 108auto/SE) que trabaja en condiciones de vacío (ilustración 2), esto con el fin de recubrir las muestras con un material conductor, en este caso oro, para poder ser leídas por el SEM. Finalmente, el exceso de polvo de oro proporcionado por el sputter fue retirado para ambas muestras de cáscara de banana empleando nuevamente el compresor.

Ilustración 2. Recubrimiento con el sputter.



Fuente: elaboración propia.

2.1.3 Caracterización de la cáscara molida. La caracterización de la cáscara retratada fue realizada por los laboratorios Dr. Calderón Laboratorios Ltda. Se realizó análisis de CHONS (Carbono, Hidrógeno, Oxígeno, nitrógeno y azufre), análisis de nitrógeno y carbono orgánico total (C/N), contenido de lignina, celulosa, hemicelulosa, proteína, almidón, grasas (lípidos), fibra cruda y carbohidratos totales. Esto permitió que fuera posible definir si la biomasa residual a trabajar como fuente de carbono cuenta con la presencia y la suficiente cantidad en cuanto a los requerimientos nutricionales para el crecimiento óptimo de las bacterias. Las metodologías empleadas para cada concepto analizado están consignadas en la tabla 3.

Tabla 3. Metodología de la caracterización.

Concepto	Método	
Análisis CHONS (C,H,O,N,S)	Carbono	Cálculo
	Hidrógeno	Cálculo
	Oxígeno	Cálculo
	Nitrógeno	Kjeldahl ¹³²
	Azufre	Turbidimetría ¹³³
Material lignocelulósico	Celulosa	Van Soest ¹³⁴
	Hemicelulosa	Van Soest ¹³⁵
	Lignina	Van Soest ¹³⁶
Proteína	Van Soest ¹³⁷	
Carbohidratos totales	Cálculo	

Tabla 4. (Continuación) Metodología de la caracterización.

Grasas (lípidos)	Gravimetría ¹³⁸
Almidón	Hidrólisis ¹³⁹
Fibra cruda	Gravimetría ¹⁴⁰
C/N	Cálculo

Fuente: elaboración propia.

Los métodos empleados por el laboratorio son: El **método de Kjeldahl** permite determinar el contenido de nitrógeno orgánico total. Esto ocurre, por medio de la conversión del nitrógeno orgánico contenido en la muestra en iones de amonio y posteriormente en amoniaco; por lo que consecuentemente se infiere la cantidad de nitrógeno orgánico total en la muestra a partir de la concentración de amoniaco obtenido¹⁴¹. El **método de Van Soest** es empleado principalmente para determinar el valor nutritivo de los alimentos y la calidad nutricional de los forrajes mediante el

¹³² KJELDAHL, J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Korpern. En: Zeitschrift für Analytische Chemie. 1883. p 366-382.

¹³³ ACEBO, D. y HERNANDEZ, A. Los métodos turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. En: Revista CENIC Ciencias Biológicas. Noviembre, 2012. p. 2-18.

¹³⁴ GOERING, M. y VAN SOESR, P. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications). Agricultural Handbook nº 379. Washington D.C. 1970. p. 9.

¹³⁵ Ibid., p. 9

¹³⁶ Ibid., p. 9

¹³⁷ Ibid., p. 9

¹³⁸ JÁCOME, J. Validación del Método Gravimétrico para la Determinación de Grasa en el Laboratorio Ecuachemlab Cía. Ltda. Trabajo de grado Ingeniería bioquímica. Ambato: Universidad técnica de Ambato. Abril, 2016. 59 p.

¹³⁹ PEÑA, A., MOLINA, D. y TORRES, R. Hidrólisis de almidón de yuca mediante la utilización de preparaciones solubles e insolubilizadas de alfa-amilasa (*Aspergillus niger*). En: Memorias del IV Simposio de Química Aplicada - SIQUIA. Septiembre, 2009.

¹⁴⁰ JÁCOME, J. Op., cit., página 47.

¹⁴¹ KJELDAHL, J. Op., cit., página 1883.

análisis de las paredes celulares y fibra de muestras orgánicas¹⁴². La **turbidimetría** es un método que opera bajo fenómenos ópticos. Una vez la luz incida en la muestra a analizar, esta se dispersa según el tipo de muestra seleccionada y aspectos tales como: forma, tamaño, la composición de la muestra y la longitud de onda de la luz incidente, incurren en los resultados obtenidos durante el análisis¹⁴³. La **gravimetría** consiste en un método cuantitativo para determinar la cantidad de un compuesto presente en una muestra determinada por medio del pesaje¹⁴⁴. Finalmente, la **hidrólisis** consiste en el fraccionamiento de macromoléculas gracias a la reacción que ocurre al interactuar con un solvente; esto permite que la muestra a hidrolizar de lugar a la formación de nuevos compuestos o división de la muestra en moléculas de interés¹⁴⁵. El carbono, hidrógeno y oxígeno fueron obtenidos de un proximal de acuerdo a los compuestos del producto y la relación carbono nitrógeno corresponde a la división entre el porcentaje de carbono y nitrógeno. El cálculo de los carbohidratos totales es obtenido a partir de un análisis bromatológico con respecto a los resultados obtenidos con el método de Van Soest cuyo protocolo es otorgado por Dr. Calderón Labs¹⁴⁶.

2.1.4 Extracción de carbohidratos. Para el aprovechamiento de los azúcares proporcionados por la biomasa residual se realizó la extracción de los azúcares de las cáscaras de banano implementando el método de hidrólisis. Este método, permite la alteración de la estructura de la lignina y facilita la extracción de los azúcares fermentables. La hidrólisis se realizó evaluando dos parámetros: temperatura y concentración del agente extractor, teniendo como variable de respuesta la cantidad de azúcares extraídos. Se evaluaron tres tipos de agentes extractores: hidróxido de sodio, ácido clorhídrico y agua. Para todos los tipos de hidrólisis realizadas se empleó la misma metodología:

Inicialmente se definieron los parámetros a evaluar con cada tipo de hidrólisis a realizar y con base a esto se planteó un modelo de experimentos para cada uno de los tipos de hidrólisis realizado. Las condiciones de diseño con respecto a cada hidrólisis realizada en este proyecto, se encuentran consignados a continuación en la tabla 4.

¹⁴² GOERING, M. Op., cit., página 8.

¹⁴³ ACEBO, D. Op., cit., página 2.

¹⁴⁴ JÁCOME, J. Op., cit., página 47.

¹⁴⁵ PEÑA, A. Op., cit., página 1.

¹⁴⁶ Laboratorios Dr. Calderón Laboratorios Ltda. Análisis bromatológico Van Soest Dr Calderón Lbs. [Citado 8 de junio de 2019] Disponible en: <file:///C:/Users/maria/Downloads/ANALISIS%20BROMATOLOGICO%20VAN%20SOEST%20-%202016.pdf>

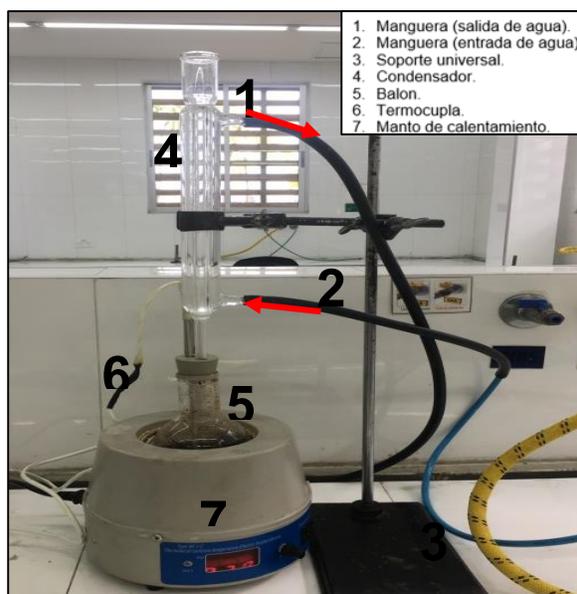
Tabla 5. Condiciones del diseño.

Hidrólisis	Factores	Niveles		Variable respuesta
Alcalina (Hidróxido de sodio)	Concentración (% p/v)	1	2	Concentración de azúcares (g/L)
	Temperatura (°C)	40	70	
Agua	Temperatura (°C)	40	70	
Ácida (Ácido clorhídrico)	Concentración (M)	0.29		
	Temperatura (°C)	40		

Fuente: elaboración propia.

Las hidrólisis se realizaron manteniendo una proporción de 5 g de cáscara pre tratada por cada 100 ml de solvente, ya sea hidróxido de sodio, ácido clorhídrico o agua. Adicionalmente, el tiempo de exposición para las hidrólisis fue de 90 minutos y se tomaron muestras de 1 ml a los 0, 30, 60 y 90 minutos en todos los experimentos realizados. También es importante resaltar que todos los experimentos se realizaron por duplicado con la finalidad de evaluar la cinética del proceso y se calculó la desviación estándar entre ambos resultados. Las hidrólisis se llevaron a cabo en un sistema de reflujo continuo mediante el montaje que se muestra en la ilustración 3.

Ilustración 3. Reflujo continuo.



Fuente: elaboración propia.

Como se aprecia, el sistema de reflujo permite que la reacción de hidrólisis transcurra a altas temperaturas el cual comprende de una etapa de calentamiento y otra de refrigeración: El material a hidrolizar (cáscara) junto con el agente extractor a la concentración deseada a tratar, se depositó en el balón (5) para someterlo a las temperaturas a evaluar, la temperatura se controló a través de un manto de calentamiento (tipo 98-1-C) (7) y para efectos de control de la temperatura se contó con una termocupla (6) que indicaba que la reacción se estuviera llevando a cabo a las temperaturas deseadas o de lo contrario se manipulaba manualmente el manto (7), manteniendo la temperatura controlada. Los vapores producidos durante el proceso ascienden hasta llegar al sistema de refrigeración. Este, consta de un condensador (4) y dos mangueras que permiten la circulación del refrigerante, en este caso, la entrada (2) y salida (1) de agua fría. El agua circula por la camisa exterior del condensador (4) y los vapores al ascender, comienzan a condensar por la camisa interior del condensador (4). De esta manera se establece un reflujo continuo sin pérdida de disolvente, mantenido el volumen de 100 ml constante en el balón.

Una vez realizada la extracción y tomadas las muestras en tubos ependorff en los tiempos establecidos y a las condiciones ya mencionadas (tabla 4), las muestras se centrifugaron. Se empleó una centrifuga "Labnet" Spectrafuge 16M Micro a 14000 rpm durante 20 minutos para las muestras tomadas de todas las hidrólisis a los tiempos establecidos. El sobrenadante obtenido en cada uno de los tubos fue separado del precipitado y almacenado en un congelador para conservar sus propiedades y posteriormente cuantificar los azúcares extraídos.

Para la determinación de carbohidratos de las muestras se empleó el método DNS o conocido también como la técnica de Miller¹⁴⁷. El método consiste en la cuantificación de azúcares reductores empleando el ácido 3,5 dinitrosalicílico bajo determinadas condiciones, los azúcares reductores tienen la capacidad de reducir el ácido en presencia de calor provocando variaciones de color desde amarillo hasta café en las muestras, la cantidad de azúcares se infiere por el color en que tornan las muestras y la concentración se cuantifica midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro a una lectura de 540 nm de longitud de onda y realizando una curva patrón del azúcar utilizado¹⁴⁸. La preparación del reactivo DNS y el desarrollo del método se efectuó siguiendo el protocolo estipulado por Malagón y Acosta¹⁴⁹. La curva patrón se realizó a partir de diferentes concentraciones de glucosa y se obtuvo la ecuación lineal con la cual se calcularon las concentraciones

¹⁴⁷ MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. En: Analytical Chemistry. Marzo, 1959. p. 426-428.

¹⁴⁸ ÁVILA, R. Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. En: Multiciencias. Marzo, 2012. vol. 12, p. 129-135.

¹⁴⁹ MALAGÓN, Dionisio y ACOSTA, Magnolia. Biosíntesis y caracterización de polímeros biodegradables del tipo PHAs. En: Manual de procedimientos. Julio, 2014. p. 13-15.

desconocidas de glucosa. Al tener el reactivo DNS ya preparado, se procedió a mezclar 150µL de las diferentes muestras hidrolizadas con el reactivo DNS y se realizó el procedimiento como lo estipula el protocolo guía¹⁵⁰.

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico por medio de un ANOVA con el fin de comparar el efecto que las condiciones de concentración y temperatura tienen sobre la concentración de azúcares obtenidos para la hidrólisis alcalina y en base de agua, mientras que para la hidrólisis ácida y la doble hidrólisis únicamente se analizaron los resultados ya que solo se realizaron a una sola temperatura y una concentración de ácido. Independientemente al tipo de hidrólisis efectuada (alcalina, a base de agua, ácida o doble), el montaje, la centrifugación y método DNS se realizaron con el mismo procedimiento y protocolos para todos de los casos.

2.1.4.1 Hidrólisis alcalina. Las concentraciones de hidróxido de sodio (NaOH) empleadas se prepararon con una base de 100 ml de solución, al 1% y 2% (p/v) y evaluadas a los 40°C y 70°C. Se plantea un modelo de 8 experimentos en total como se observa en la tabla 5 en el cual se tomaron 32 muestras teniendo en cuenta los tiempos y contando con su duplicado.

Tabla 6. Diseño de experimentos para la hidrólisis alcalina.

Experimento	Factor concentración (% W/V)	Factor temperatura (°C)
1	1	40
2	2	40
3	1	70
4	2	70

Fuente: elaboración propia.

Según los factores evaluados el análisis de varianza se realizó por medio de un ANOVA 2x2. Este análisis se llevó a cabo con la distribución *F* y un nivel de significancia de 5% dando un buen porcentaje restante de confiabilidad a los resultados obtenidos experimentalmente. A continuación, se detallan las hipótesis formuladas para cada parámetro y su interacción.

Para la temperatura:

H₀= La variación de la temperatura no afecta la extracción de azúcares.

H₁= La variación de la temperatura afecta la extracción de azúcares.

¹⁵⁰ Ibid., p. 14-15.

Para la concentración:

H₀= La variación de la concentración no afecta la extracción de azúcares.

H₁= La variación de la concentración afecta la extracción de azúcares.

Interacción entre los dos factores:

H₀=La variación de los dos factores no afecta la extracción de azúcares.

H₁= La variación de los dos factores afecta la extracción de azúcares.

2.1.4.2 Extracción a base de agua. Debido a que el solvente empleado es agua únicamente se variaron los parámetros de temperatura a 40°C y 70°C. Se plantea un modelo de 4 experimentos como se observa en la tabla 6 y tomando 16 muestras en total en los tiempos establecidos y contando con su duplicado.

Tabla 7. Diseño de experimentos para la hidrólisis con agua.

Experimento	Factor temperatura (°C)
1	40
2	70

Fuente: elaboración propia.

Debido a que únicamente se evalúa un factor con dos niveles, el análisis de varianza se realizó por medio de un ANOVA 1x2. Al igual que en la hidrólisis alcalina, el análisis estadístico se realizó por medio de la distribución F a un nivel de significancia de 5% con las siguientes hipótesis formuladas:

H₀= La variación de la temperatura no afecta la extracción de azúcares.

H₁= La variación de la temperatura afecta la extracción de azúcares.

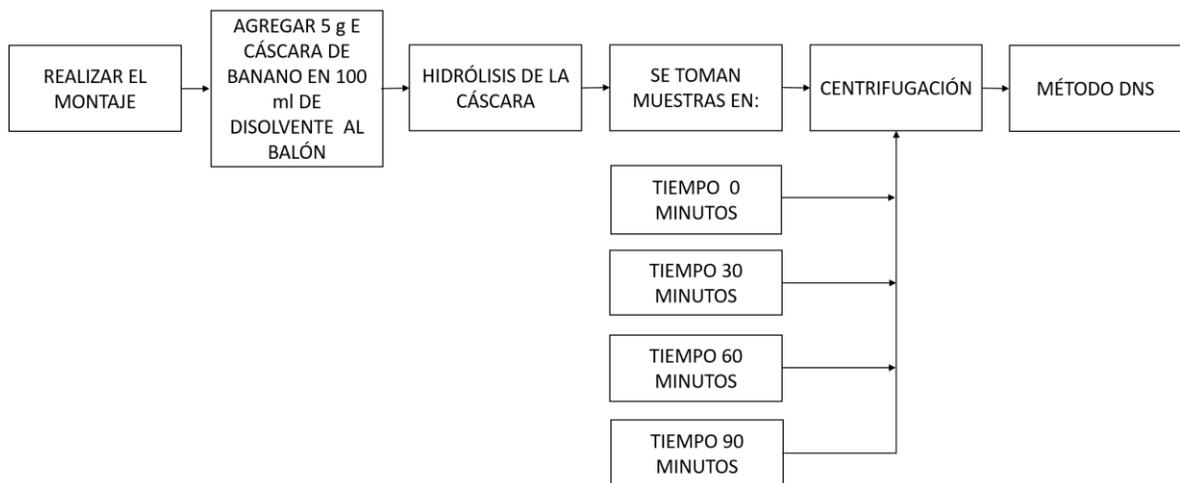
2.1.4.3 Hidrólisis ácida. Se empleó ácido clorhídrico (HCl) a una concentración baja de 0.29 M y una temperatura de 40°C dado que fue la temperatura a la cual se obtuvieron más altas concentraciones de azúcar extraído en la hidrólisis alcalina. Por tanto, únicamente se tomaron 8 muestras en total contando su duplicado.

2.1.4.4 Extracción a base agua e hidrólisis ácida. Para llevar a cabo la doble hidrólisis se tuvieron en cuenta las mejores condiciones a las cuales se obtuvieron la mayor cantidad de azúcares extraíbles tanto en la hidrólisis alcalina, la hidrólisis a base de agua y la hidrólisis ácida con respecto al tiempo y a la temperatura. Debido a que los mejores resultados se dieron a partir de la extracción en base de agua a cierta temperatura y tiempo de exposición, este experimento fue repetido a estas condiciones. Luego de realizar la centrifugación se separó el precipitado del sobrenadante, y se realizó la segunda extracción al precipitado con

la hidrólisis ácida dado los resultados obtenidos en comparación con la hidrólisis alcalina al mejor tiempo. Por tanto, se tomaron 8 muestras en total contando su duplicado y teniendo en cuenta que para este experimento se evaluó las muestras obtenidas en la segunda hidrólisis.

A continuación, en la figura 7 se muestra un diagrama general del procedimiento que se llevó a cabo para las hidrólisis realizadas:

Figura 7. Diagrama de proceso para las hidrólisis.



Fuente: elaboración propia

2.1.5 Comprobación del proceso fermentativo. Para el total aprovechamiento de la cáscara de banana y dados los resultados obtenidos en el apartado anterior, se procedió a verificar el crecimiento de las bacterias en medios de cultivo suplementados con el sólido suspendido por medio de dos ensayos: una en un medio sólido de agar básico y otra en medio líquido de RCM, sin embargo, previo a la inoculación de estos medios se procedió a verificar la supervivencia de las células por medio el método de tinción de Gram.

2.1.5.1 Visualización de las células. El presente proyecto se llevó a cabo empleando las cepas *Clostridium butyricum* DSM 2478 donadas por el banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN) en Bogotá. Para verificar la supervivencia de las células se empleó el método de tinción de Gram siguiendo el protocolo guía¹⁵¹, este procedimiento consiste en la clasificación de los microorganismos según sus diferencias en la estructura de sus

¹⁵¹ UNIVERSIAD TECNOLÓGICA NACIONAL. Tinción y observación de microorganismos. [Citado 19 de marzo de 2019] Disponible en: <https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf>

paredes celulares constructivas. El procedimiento fue desarrollado por Hans Christian Gram en 1884 donde la reacción provocada depende de la retención del color según la bacteria, si la retención de color es azul-violeta, el microorganismo se clasifica como Gram positivo y si torna un color rojo-rosado son Gram negativos¹⁵².

2.1.5.2 Medio sólido en agar básico. Para la preparación del medio en agar básico, se disolvieron 6 g de agar-agar en 150 ml de agua destilada. La solución fue colocada a calentar en una plancha de calentamiento para disolver por completo el agar hasta alcanzar el punto de ebullición. Posteriormente se procedió a verter la solución calentada en Erlenmeyer repartiéndolos por igual cantidad, quedando cada uno con un volumen de 50 ml de solución y se agregó la cáscara de banano en tres concentraciones diferentes a cada uno: 2.5 g/100ml y 5 g/100ml, una vez listo el medio los Erlenmeyer fueron sellados y llevados a una autoclave para ser esterilizados. Finalizada la esterilización, los medios fueron vertidos en seis cajas de Petri en una cámara de flujo laminar donde se conservan las condiciones de asepsia durante la transferencia del medio a las cajas. Para cada una de los medios preparados con las concentraciones diferentes de cáscara se prepararon dos cajas de Petri con un total de 4 cajas, cuando el agar-agar se solidificó se realizó la siembra empleando un asa redonda. Finalmente, las cajas de Petri se llevaron a una jarra de anaerobiosis y se introdujeron en la incubadora a 37°C.

2.1.5.3 Medio líquido en RCM. El medio reforzado de *Clostridium* (RCM), es un medio que le proporciona excelentes condiciones a la bacteria para su crecimiento a partir de inóculos pequeños¹⁵³. Para la preparación del RCM (medio reforzado de *Clostridium*), se prepararon 3,8 g de RCM en 100 ml de agua destilada para mantener la proporción de 38g/L según la ficha de datos de seguridad de RCM Merck¹⁵⁴, posteriormente se agregaron 5 g de cáscara banano al medio y dado que es necesario que el medio adecuado para las bacterias sea neutro, se midió el pH del medio mediante un pHmetro (JENWAY 3520), obteniendo un pH inicial de 6,7 por lo cual fue necesario ajustarlo empleando NaOH a 0,1M alcanzando así un pH de 7. Finalmente, la solución fue sometida a calentamiento hasta conseguir la ebullición del agua. La solución fue vertida en un vial y se procedió a taponar con un tapón de caucho reforzada con un agrafe, el vial fue llevado a la autoclave para esterilizar el medio. Una vez esterilizado y alcanzada la temperatura ambiente del medio, se realizó la inoculación tomando 1 ml de la cepa pura con una jeringa e

¹⁵² YAZDANKHAN, S.; et al. Use of magnetic beads for Gram staining of bacteria in aqueous suspension. *En: Journal of Microbiological Methods*. September 2001. p. 369-371.

¹⁵³ CULMITE. Op. cit. p. VI.

¹⁵⁴ MERCK. Ficha de datos de seguridad. [Citado 19 de marzo de 2019] Disponible en: <http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-RU-Site/ru_RU/-/USD/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-105411&DocumentId=201602.356.ProNet&DocumentUID=28219503&DocumentType=DS&Language=EN&Country=NF&Origin=PDP>

introduciéndola al vial con el medio previamente esterilizado. El medio fue llevado a la jarra de anaerobiosis e incubado a 37°C. El medio de cultivo empleado es de la marca Merck con la composición expuesta en la tabla 7 a continuación.

Tabla 8. Composición RCM. Composición RCM.

Compuesto	Concentración (g/L)
Peptona	10
Extracto de levadura	3
Extracto de carne	10

Tabla 7. (Continuación).

Glucosa	5
Almidón	1
L- cisteína	0.5
Acetato sódico	3
Cloruro de sodio	5
Agar	0.5

Fuente: elaboración propia.

- **Factores de crecimiento.** las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa fueron seleccionadas de acuerdo a todos los recursos bibliográficos consultados y a los resultados obtenidos y reportados en esta sección. Los factores de crecimiento a trabajar en todas las fermentaciones fueron a temperatura de 37°C, presión atmosférica y un pH de 6.5. Las concentraciones de sustrato (cáscara de banano) seleccionadas fueron de 5%, 2.5% y 0% por tanto se llevaron a cabo tres fermentaciones con las mismas condiciones de temperatura, presión, pH y composición del medio de cultivo (nutrientes) con la variación de sustrato seleccionadas para cada medio. Debido a que las *Clostridium Butyricum* son anaerobias estrictas, los medios de cultivos deben presentar condiciones anóxicas, por tanto, se trabajó con jarras de anaerobiosis y sobres de anaerogen para crear las condiciones anaerobias.

2.1.6 Fermentación a escala laboratorio. Previo a ejecutar la fermentación fue necesario realizar una pre inoculación con el fin de lograr la activación de la cepa. Las fermentaciones se llevaron a cabo en viales de 100 ml y la pre inoculación en un vial de 120 ml, todos con tapones de caucho y asegurados con agrafes de aluminio para impedir el escape de gas y evitar el salto del tapón por la presión de los gases generados. La cuantificación de la biomasa fue realizada por cámara de

Neubauer^{155,156} y el medio de cultivo empleado en todas las fermentaciones es RCM.

2.1.6.1 Pre-inoculación. Se prepararon 100 ml de medio RCM a las mismas condiciones e igual procedimiento al expuesto en la sección anterior, pero sin cáscara de banano. Se inóculo 1 ml de la cepa original donada por el IBUN y se incubo a 37°C durante 24 horas con el fin de promover el crecimiento de las bacterias.

2.1.6.2 Inoculación. Pasadas las 24 horas, el inóculo se realizó transfiriendo del vial del pre inóculo a los medios de cultivo con RCM a las concentraciones de cáscara escogidas. Las concentraciones de cáscara seleccionadas fueron 0%, 2.5% y 5%; esto con el fin de comparar los efectos de la cáscara de banano en el medio. Por tanto, se inocularon 6 medios de cultivo, tres con la composición de cáscara mencionada y otros tres contando su duplicado, con el fin de tener en cada proceso dos datos y calcular la desviación estándar entre ellos.

2.1.6.3 Cuantificación de biomasa, medicion de ph, determinación de solventes y acidos grasos, consumo de sustrato y determinacion de hidrógeno. Una vez comenzada la fermentación, se tomaron muestras cada 8 horas por 4 días. Se emplearon jeringas comerciales de 3 ml tanto para las muestras líquidas como para las muestras de gas y se analizó por medio de cinéticas la cuantificación de biomasa, la medición de pH, la determinación de solventes y ácidos grasos, el consumo de sustrato y determinación de hidrógeno.

Las muestras líquidas fueron depositadas en tubos eppendorf para poder cuantificar el crecimiento de las bacterias, una vez realizado el conteo por cámara de Neubauer (BOECO BOE01), los tubos fueron centrifugados en una microcentrifuga ("Labnet" Spectrafuge 16M Micro) a 14000 rpm durante el tiempo que fuera necesario para la separación del sobrenadante (metabolitos producidos) del precipitado (cáscara y biomasa) y así poder ser enviado el sobrenadante resultante a cromatografía líquida de alta resolución HPLC para la identificación y determinación de la concentración de los productos líquidos obtenidos durante la fermentación. El equipo de HPLC empleado consta de una columna AMINEX HPX – 87H a una temperatura constante de 65°C que contaba con un detector Shimadzu® RID 10A por índice de refracción. El software empleado para los cromatogramas fue Lab Solutions (versión 1.25.). Para la fase móvil se empleó un flujo de 0.5 ml/min utilizando ácido sulfúrico y el volumen de inyección fue de 10 µl por muestra analizada. A las muestras también se les midió la acidificación del medio con el pH utilizando un pHmetro (JENWAY

¹⁵⁵ CASTILLO, Gabriela. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Instituto mexicano de tecnología del agua, coordinación de tecnología de comunicación, participación e información, subcoordinación de editorial y gráfica. 1 ed. México, 2004. p. 90-92.

¹⁵⁶ ARREDONDO, Bertha y VOLTOLINA, Domenico. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En: Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. México, 2007. p. 21-29.

3520) y con los resultados reportados por la cromatografía se logró determinar los solventes, ácidos grasos y consumo de sustrato.

Para determinar el crecimiento celular en el medio de 5% de cáscara de banano se calculó la constante de velocidad por medio de la ecuación 11.

Ecuación 11. Constante de velocidad.

$$C = \frac{(N - N_0)}{(t - t_0)}$$

Fuente: INGRAHAM, John *et al.* Microbiología (2005).

Para la determinación de hidrógeno, las muestras de gases fueron aseguradas con silicona alrededor de la tapa para evitar el escape y luego fueron enviadas a cromatografía de gases GC. El equipo empleado es de la marca Shimadzu®. El sistema de cromatografía tiene una columna Poparal Q (malla 80/100) en acero inoxidable que se mantuvo a una temperatura de 90°C durante el análisis. Cuenta con un detector de conductividad térmica TDC el cual se mantuvo a una temperatura de 150°C. La fase móvil empleada fue nitrógeno, el gas de arrastre tuvo un flujo de 20 ml/min. Con una temperatura de 100°C en el inyector, se analizaron 3 ml por muestra y con los resultados obtenidos fue posible determinar la concentración de hidrógeno en cada muestra con el software empleado Shimadzu® (versión 4.5) utilizando una curva patrón estándar de hidrógeno proporcionada por el IBUN.

2.1.6.5 Degradación de la cáscara. Una vez finalizadas las fermentaciones y con el fin de comprobar la degradación de la cáscara por parte de las bacterias, se realizó la comparación de cáscara obtenida al final y al comienzo de la fermentación. Para ello, el medio de cultivo resultante fue sometido a una filtración por precipitado y posteriormente los sólidos resultantes fueron colocados a secar en un horno (Binder FD 23) por 24 horas a una temperatura de 110°C para eliminar el agua absorbida por el material. Finalmente, por medio del peso se determinó la degradación de la cáscara por parte de las bacterias en cuanto a la cantidad de cáscara inicialmente agregada.

2.2 RESULTADOS

En esta sección se detallan los datos obtenidos durante el proceso desde la recolección de la cáscara de banano, hasta la fermentación a escala laboratorio, su análisis e implicación en el proyecto.

2.2.1 Recolección de la cáscara. Se logró recolectar un total de 30 kg de cáscara de banano, de los cuales se seleccionaron aquellas en condiciones completamente

maduras, pero no un estado demasiado avanzado; lo que corresponde a una escala de color entre 5 y 6 como se observa en la figura 5, es decir, que está en un estado óptimo donde hay presencia de azúcares¹⁵⁷, por lo que finalmente se conservaron 25,28 kg de cáscara (ilustración 4).

Ilustración 4. Cáscaras días previos a la experimentación.

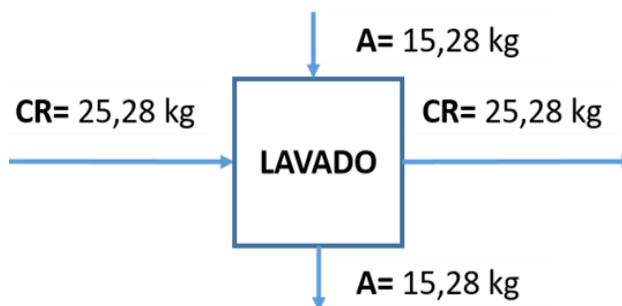


Fuente: elaboración propia

2.2.2 Pretratamiento de la cáscara. Los resultados que corresponden al pretratamiento son analizados en esta sección.

2.2.2.1 Lavado de las cáscaras. Debido a que el lavado de la cáscara fue únicamente superficial, no hubo pérdida ni de la cáscara ni de agua y por tanto la cantidad de cáscara y agua utilizada que entró es igual a las que salió, tal y como se muestra en la figura 8.

Figura 8. Balance de materia para el proceso de lavado.



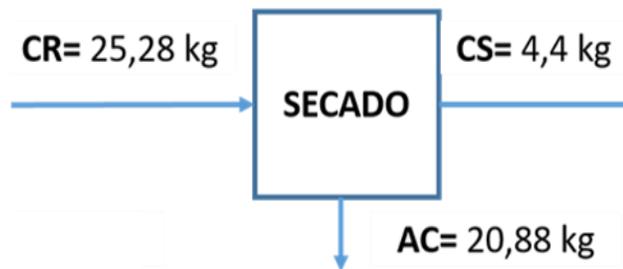
Fuente: elaboración propia.

Donde, CR= Cáscara recolectada y A= Agua.

¹⁵⁷ ESCALANTE. Op., cit., página 123.

2.2.2.2 Secado de las cáscaras. Una vez finalizado el secado solar de las cáscaras de banano, se tomó nuevamente la masa de las cáscaras de banano para analizar la pérdida de agua, registrando un nuevo valor de 4,4 kg para los 25.28 kg recolectados inicialmente con lo cual fue posible el cálculo del porcentaje de humedad a partir de la ecuación 4. Por tanto, los resultados obtenidos durante el proceso de secado solar de las cáscaras mostraron que estas presentaban un porcentaje de humedad de 82.6%. El balance de materia correspondiente a la sección de secado se ilustra en la figura 9 a continuación.

Figura 9. Balance de materia para el proceso de secado.

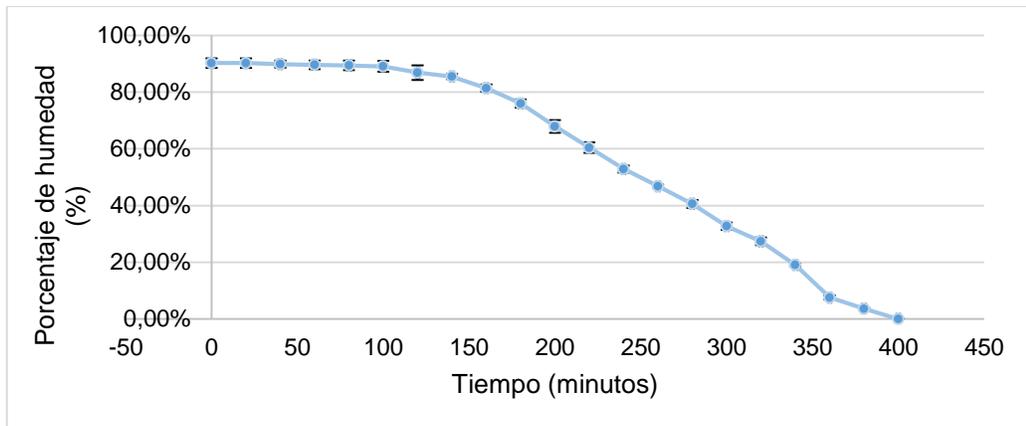


Fuente: elaboración propia.

Donde, CR= Cáscara recolectada, AC= Agua retirada de las cáscaras y CS= Cáscaras secas.

- **Determinación de la humedad de las cáscaras:** los datos obtenidos para la curva de humedad con respecto al tiempo son representados gráficamente en la gráfica 1, los datos obtenidos durante la prueba se encuentran consignados en el anexo A.

Gráfica 1. Curva de secado de la cáscara de banano a temperatura constante.



Fuente: elaboración propia.

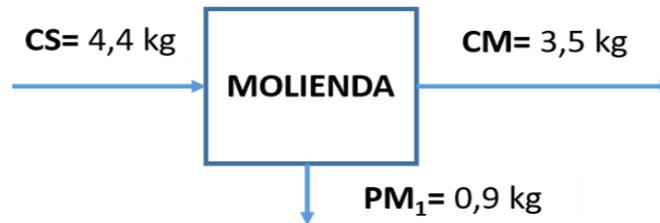
En la gráfica 1 se presenta el comportamiento de la pérdida de humedad de la cáscara de banano a través del tiempo. A partir de dicha gráfica se logró determinar que el porcentaje de humedad de las cáscaras es de $90,24\% \pm 0,017$. Al comparar este porcentaje de humedad con el de las cáscaras secadas al exponerlas al sol, se ve que en el ensayo en condiciones controladas se deshidratan más las cáscaras; la diferencia corresponde a un $7,64\%$. El porcentaje de humedad reportado por Odedina¹⁵⁸ es de $82,3\%$, lo cual indica un porcentaje de humedad distinto entre las muestras empleados en el citado trabajo y este.

- **Determinación de la humedad de la cáscara molida:** el porcentaje de humedad de la cáscara molida es de $1,5\%$, el cual es bajo comparado con los porcentajes anteriores, esto es debido a que la cáscara pudo adquirir humedad del ambiente durante los procesos consecutivos al secado, aunque esta no es significativa.

2.2.2.3 Proceso de molienda. Fue evidente la pérdida de material por molienda debido a que se obtuvieron $3,5$ kg de cáscaras de banano molida puesto que fue el nuevo peso registrado una vez finalizada la molienda y antes de ser sometido al tamizado. En la figura 10 se ilustra el balance de materia de esta sección.

¹⁵⁸ ODEDINA, Mary, et al. Effects of size and thermophilic pre-hydrolysis of banana peel during anaerobic digestion, and biomethane potential of key tropical fruit waste. En: Waste management. Julio, 2017. vol. 68. p.128-138.

Figura 10. Balance de materia del proceso de molienda.

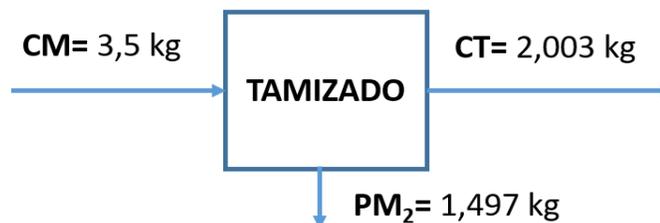


Fuente: elaboración propia.

Donde, CS= Cáscara secas, PM₁= Pérdida de cáscara por molienda y CM= Cáscaras molidas.

2.2.2.4 Proceso de tamizado. Una vez finalizado el proceso de molienda, el material resultante fue sometido a un proceso de tamizado. En la figura 11 se aprecia el balance de materia de esta sección.

Figura 11. Balance de materia del proceso de tamizado.



Fuente: elaboración propia.

Donde, CM= Cáscara molida, PM₂= Pérdida de cáscara por tamizado y CT= Cáscaras molidas y tamizadas.

Para el análisis de tamizado se realizó el cálculo del diámetro de partícula por medio de la ecuación 5 para cada una de las mallas. Adicionalmente se determinó la fracción másica retenida en cada malla por medio de la ecuación 6. En la tabla 8 que se encuentran consignadas los diámetros de partícula obtenidos y su respectiva fracción másica calculada.

Tabla 9. Diámetros, pesos retenidos y fracción másica retenida en cada una de las mallas.

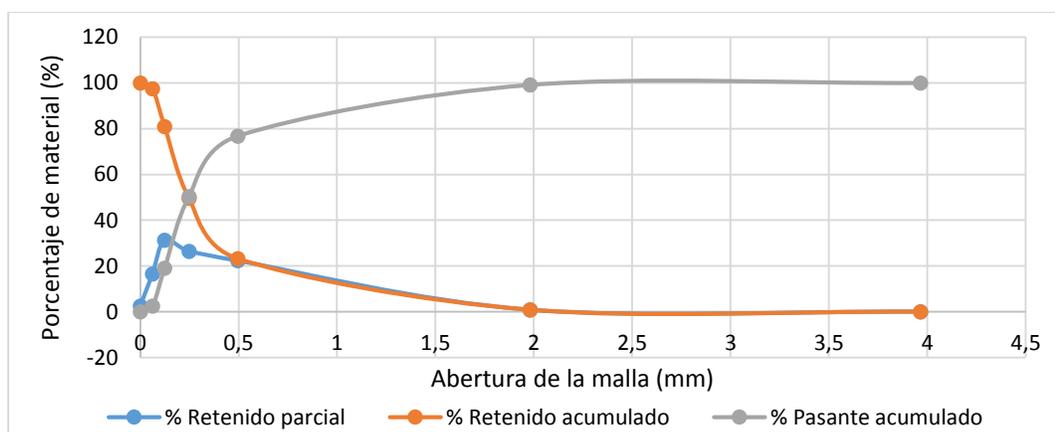
No. malla	Abertura (mm)	Diámetro de partícula D_p (mm)	Masa retenida (g)	Fracción másica
5	3,965	-	0,7	0,000349
10	1,982	2.9735	52,3	0,0261
35	0,496	1.239	390	0,195
60	0,248	0.372	520	0,260
120	0,124	0.186	630	0,314
230	0,062	0.093	405	0,202
Fondos	0	5	5	0,00249
TOTAL	-	-	2003	-

Fuente: elaboración propia.

A partir de los datos obtenidos en la tabla 8, es posible realizar un análisis en cuanto a la relación de los diámetros de partícula con la fracción másica mediante la ecuación 7 que corresponde al cálculo del diámetro medio de masa (D_s). Se concluye que el diámetro de partícula promedio es de 0,492 mm, lo que es adecuado al requerimiento del proceso, pues se requiere un tamaño menor a 0,5 mm.

De manera ilustrativa se evidencia en la gráfica 2 el análisis de tamizado que corresponde al porcentaje retenido, el porcentaje retenido acumulado y el porcentaje pasante acumulado calculado a partir de las ecuaciones 8, 9 y 10 para cada malla y cuyos respectivos resultados están consignados en el anexo B.

Gráfica 2. Curva de análisis de tamizado.



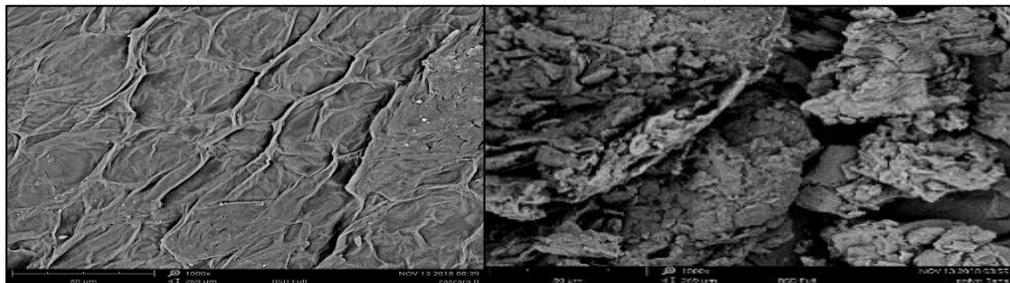
Fuente: elaboración propia.

Es posible concluir que en la malla de apertura de 1,9 mm (malla 10) tiene la abertura suficiente para obtener el 100% acumulado. También se observa que la

mallas 60 y 120. La malla 120 es la que cuenta con un mayor porcentaje de retención de material con un valor de 31,27%, cuenta con una abertura de 0.125 mm. A partir de esto se podría inferir que gran cantidad del material tamizado tiene un tamaño de partícula menor que el de la malla 60 (0.246 mm) pero mayor que el de la malla 120. El punto de intersección de las líneas de porcentaje retenido acumulado y del porcentaje pasante acumulado representa un punto de equilibrio de la parte másica del material, es decir, que el 50% del material se encuentra dividido por la malla 60 con una abertura de 0,246 mm. Adicionalmente, se calculó el porcentaje de error entre la masa inicial, antes de realizar el proceso de tamizado, y la masa final, la sumatoria de todos los pesos obtenidos en cada malla en lo cual se obtuvo un porcentaje de 0.354%, por lo que las pérdidas generadas durante el tamizado están dentro de lo aceptado, según lo especificado anteriormente.

- **Análisis por microscopía electrónica de barrido.** Las imágenes resultantes proporcionadas por el SEM son mostradas en la ilustración 5, esta corresponde a la muestra de la cáscara de banano sin moler (izquierda) y molida (derecha). Al comparar las dos imágenes se puede ver que en ambas se presentan poros, aunque en la muestra de la cáscara molida es menor la presencia de estos, lo que puede deberse al tamaño de las partículas.

Ilustración 5. Estructura de la cáscara de banano sin moler y molida.



Fuente: elaboración propia.

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Pathak¹⁵⁹ y El-Din¹⁶⁰ con respecto a la cáscara de banano sin moler, es posible apreciar en la ilustración 5 la estructura que presenta la superficie de la muestra analizada además de que observa claramente la textura algo rugosa una vez las cáscaras estén completamente secas y se aprecian los poros que presenta la superficie de la misma. Para la muestra de cáscara molida, se aprecian diferentes tamaños de partículas a los cuales se redujo una muestra de cáscara de banano por medio de la molienda. En la muestra de la cáscara de banano molida se pueden

¹⁵⁹ PATHAK, Pranav y MANDAVGANE, Sachin. Preparation and characterization of raw and carbon from banana peel by microwave activation: Application in citric acid adsorption. En: Journal of environmental chemical engineering. Septiembre, 2015. vol. 3. p. 2435-2447.

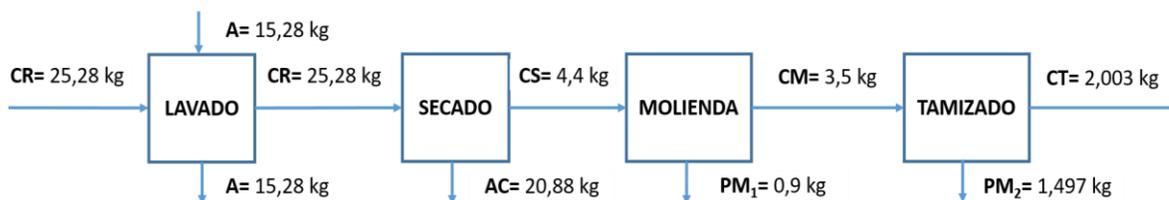
¹⁶⁰ EL-DIN, Alaa, *et al.* Op. Cit., p. 1-8.

observar las diferentes partículas que se presentan, cada una con un tamaño y una estructura en particular; también se observa que la forma de cada una de ellas es completamente amorfa y que no existe uniformidad alguna en cuanto a su tamaño y la forma de los poros que presentan cada una de ellas. En cuanto al tamaño de partículas, la más grande comprende un valor de 298 μm mientras que la más pequeña presenta un tamaño de 26,9 μm . A pesar de que la cantidad de muestra analizada en el SEM no es significativa, los tamaños obtenidos en esta se encuentran por debajo de 0,492 mm, lo que significa que estos valores se ajustan a lo observado en el análisis de diámetros que se hizo en el tamizado.

La muestra seleccionada para continuar con la extracción de los azúcares de la cáscara será el material pasante desde la malla 10, que corresponde al tamaño de partícula adecuado.

2.2.2.5 Balance de materia global. A continuación, en la figura 12 y tabla 9 se muestra el diagrama de bloques con su respectivo balance de materia global con respecto al pretratamiento al que fueron sometidas las cáscaras de banano previo a la caracterización y fermentación a escala laboratorio.

Figura 12. Diagrama de bloques para el balance de materia global.



Fuente: elaboración propia.

Tabla 10. Balance global de materia del pretratamiento de la cascara.

Balance de materia global		
Corriente	Entrada (kg)	Salida (kg)
Cáscaras recolectadas (CR)	25,28	
Agua (A)	15,28	15,28
Agua de las cáscaras (AC)		20,88
Pérdida de material en la molienda (PM₁)		1,497
Pérdida de material en el tamizado (PM₂)		0,9
Cáscaras molidas y tamizadas (CT)		2,003
TOTAL	40,56	40,56

Fuente: elaboración propia.

La nomenclatura faltante: CS= Cáscaras secas y CM=Cáscaras molidas.

Una vez finalizado todo el pre tratamiento de la cáscara de banano, de los 25,28 kg de cáscara inicial se obtuvieron 2.003 kg de cáscara finalmente la cual fue empleada para los siguientes procesos a realizar.

2.2.3 Caracterización de la cáscara molida y tamizada. Los resultados obtenidos en los distintos análisis para para la caracterización de la cáscara molida y tamizada se encuentran a continuación consignados en la tabla 10 y se encuentran reportados en base seca.

Tabla 11. Composición de la biomasa residual en base seca.

Compuesto		Porcentaje (%)
Análisis CHONS (C,H,O,N,S)	Carbono	39,37
	Hidrógeno	5,67
	Oxígeno	39,37
	Nitrógeno	1,2
	Azufre	0,11
Material lignocelulósico	Celulosa	8,64
	Hemicelulosa	14,16
	Lignina	9,76
Proteína		7,5
Carbohidratos totales		40,36
Grasas (lípidos)		5,24
Almidón		38,34
Fibra cruda		8,98
C/N (Adimencional)		32,81

Fuente: elaboración propia, con base en: resultados por Dr. Calderón Laboratorios Ltda (2019).

El contenido de CHONS es similar con los reportados por Pathak¹⁶¹ y por Chaiprapat¹⁶², donde las cantidad reportada para el oxígeno (52,14% y 39,6% respectivamente) es la que más difiere, esto puede deberse al estado de maduración del fruto, puesto que este compuesto es necesario para la producción de etileno, el cual causa la maduración en las frutas¹⁶³. En cuanto a la diferencia en

¹⁶¹ PATHAK, Pranav y MANDAVGANE, Sachin. Op. Cit., p. 2437.

¹⁶² CHAIPRAPAT, Sumate, *et al.* Effects of size and thermophilic pre-hydrolysis of banana peel during anaerobic digestion, and biomethanation potential of key tropical fruit wastes. *En: Waste Management.* 2017. p. 2-11.

¹⁶³ BLASCO, Manuel. UF0013: Recolección, transporte, almacenamiento y acondicionamiento de la fruta. 5.1 ed. España. 29-30 p. ISBN: 978-84-16275-63-2.

la proporción carbono/nitrógeno reportada por Chaiprapat¹⁶⁴, la cual es de 23,1, puede deberse a la poca diferencia de nitrógeno presente en la cáscara. Romero¹⁶⁵ reporta cantidades de celulosa de 10% y hemicelulosa de 14%, las cuales son cercanas a los valores obtenidos en la tabla 10, se puede inferir que esto se debe a que las cáscaras tanto tratadas por Romero como las de este proyecto fueron sometidas a una trituración para lograr la cristalización de la celulosa¹⁶⁶; sin embargo la cantidad de lignina reportada por Romero¹⁶⁷ es de 14% mientras que la obtenida en la tabla 10 es de 9,76%, esta diferencia se puede dar porque hubo un mejor rompimiento de la lignina durante la trituración en las cáscaras tratadas en este proyecto. El almidón obtenido es mayor que el reportado por Mohapatra *et al* en su artículo: “Banana and its by-product utilisation: an overview”¹⁶⁸, esto puede deberse a que en la muestra examinada el almidón no ha sido completamente transformado en azúcares simples¹⁶⁹. Lo anterior contrasta con el índice de color de la cáscara que se mencionó en el apartado 2.1.1, debido a que allí se expone que el color de la cáscara conlleva a la presencia de azúcares simples; este contraste se puede deber a la rápida velocidad de respiración que presenta el banano¹⁷⁰, puesto que esta es la encargada del cambio de color de la fruta durante la maduración¹⁷¹ haciendo que no se de una completa transformación del almidón pero sí llevando a la cáscara visiblemente de un estado de maduración óptimo a uno más avanzado. La cantidad de carbohidratos totales, es semejante a la obtenida por Mohapatra *et al*¹⁷², lo que indica que la cáscara brinda buenas condiciones nutricionales para el crecimiento de la bacteria y suplemento del medio de cultivo; teniendo en cuenta que el porcentaje de carbohidratos contenidos en el residuo agrícola son altos resulta ser un buen sustrato para la cepa.

2.2.4 Extracción de carbohidratos. En esta sección se encuentran los datos obtenidos de las extracciones de azúcares realizadas a la cáscara de banano. Se realizó un análisis gráfico de la concentración de azúcares obtenida con respecto a los tiempos en que se tomaron las muestras (0, 30, 60 y 90 minutos) a cada experimento para analizar la cinética del proceso. Para la cuantificación de los carbohidratos por DNS, las disoluciones de glucosa, sus respectivas absorbancias,

¹⁶⁴ CHAIPRAPAT, Sumate, *et al.* Op. Cit., p. 4.

¹⁶⁵ ROMERO, Hugo, AYALA, Humberto, LAPO, Byron. Op. Cit., p. 81.

¹⁶⁶ *Ibid.*, p. 80

¹⁶⁷ *Ibid.*, p. 81

¹⁶⁸ MOHAPATRA, Debabandy; MISHRA, Savyasachi y SUTAR, Namrata. Banana and its by-product utilisation: an overview. En: Journal of scientific & industrial research. Mayo, 2010. vol. 69 p. 324.

¹⁶⁹ GIRALDO, German, et al. Caracterización fisicoquímica del mango común (*mangifera indica* L.) durante su proceso de maduración. En: Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustria. Enero, 2013. vol. 11, no. 1, p. 10-18.

¹⁷⁰ ARANCETA, Javier y PEREZ, Carmen. Frutas, verduras y salud. Frutas – maduración de las frutas. Barcelona: Masson, 2006. p. 1-8. ISBN: 978-84-458-1669-1.

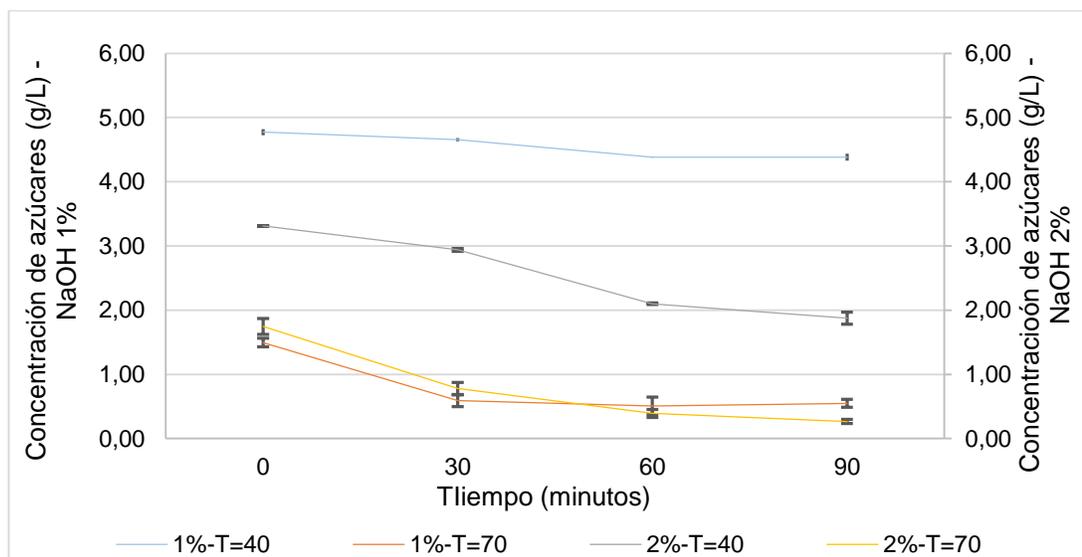
¹⁷¹ *Ibid.*, p. 8

¹⁷² MOHAPATRA, Debabandy; MISHRA, Savyasachi y SUTAR, Namrata. Banana and its by-product utilisation: an overview. En: Journal of scientific & industrial research. Mayo, 2010. vol. 69 p. 327.

la curva patrón y la ecuación lineal obtenida y los resultados de las absorbancias obtenidos en la espectrofotometría para todas las muestras tomadas se encuentran en el anexo D junto con las concentraciones de azúcares equivalentes y las tablas de las disoluciones que fueron necesarias realizar.

2.2.4.1 Hidrólisis alcalina. Como se muestra en la gráfica 3, se pueden observar los resultados obtenidos en la hidrólisis alcalina donde se determina la concentración de azúcares con respecto al tiempo evaluando la temperatura y la concentración de NaOH. El ANOVA obteniendo es mostrado en el cuadro 2.

Gráfica 3. Cinética de hidrólisis alcalina.



Fuente: elaboración propia.

Cuadro 3. ANOVA (hidrólisis alcalina).

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Temperatura	14,827	14,827	821,107	7,708
Concentración	3,896	3,896	215,752	7,708
Interacción	2,471	2,471	136,867	7,708
Dentro del grupo	0,072	0,018		
Total	21,267			

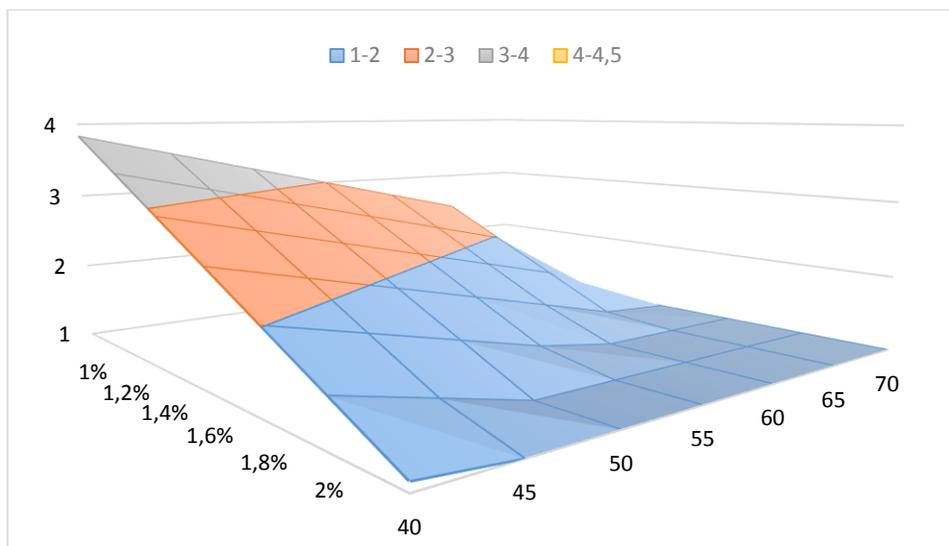
Fuente: elaboración propia.

Según la distribución F , si $F > F_{\text{crítica}}$ la hipótesis nula se rechaza. Dado este parámetro y según los resultados obtenidos en el cuadro 2, las tres hipótesis nulas formuladas son rechazadas; por lo que la variación de la temperatura, concentración y la interacción de ambos afecta la concentración de azúcares extraídos, es decir, que la manipulación de estos factores, varían la concentración de azúcares obtenidos, lo cual es posible evidenciarlo en la gráfica 3. En la gráfica se observa la tendencia a disminuir la concentración de azúcares con el paso del tiempo, por lo que se consideró poco efectiva la hidrólisis de tipo alcalina. También, es evidente que la cáscara de banano contiene una alta cantidad de azúcares solubles, puesto que para ambos casos en el tiempo 0 se obtiene la mejor concentración en comparación con las demás concentraciones obtenidas a lo largo de la cinética; se infiere que este efecto se puede deber a la degradación de los azúcares por parte del NaOH en el tiempo, efecto contrario al que se pretendía obtener con la extracción por medio de este método, esto se puede deber a la producción de furfural y ácido acético como lo reporta Muthukumar¹⁷³, los cuales son productos de la degradación de los azúcares. La comparación de ambas cinéticas, a 40 °C y a 70 °C, permitió establecer que a la temperatura más baja se lograba obtener una mayor cantidad de azúcares en la extracción básica, este comportamiento se demostró tanto a concentración del 1% y 2%.

Sin tener en cuenta el tiempo, a continuación, en el gráfico 4, se muestra la superficie de respuesta (ANEXO G) que optimizan los valores de la concentración alcalina y temperatura para mejores obtener mejores concentraciones de azúcares extraídos dentro de los rangos trabajados el cual concuerda con la cinética realizada.

¹⁷³ MUTHUKUMAR, Karuppan y VELMURUGAN, Rajendran. Ultrasound-assisted alkaline pretreatment of sugarcane bagasse for fermentable sugar production: Optimization through response surface methodology. En: Bioresource Technology. Febrero, 2012. vol.112. p. 293-299.

Gráfica 4. Superficie de respuesta de la hidrólisis alcalina.

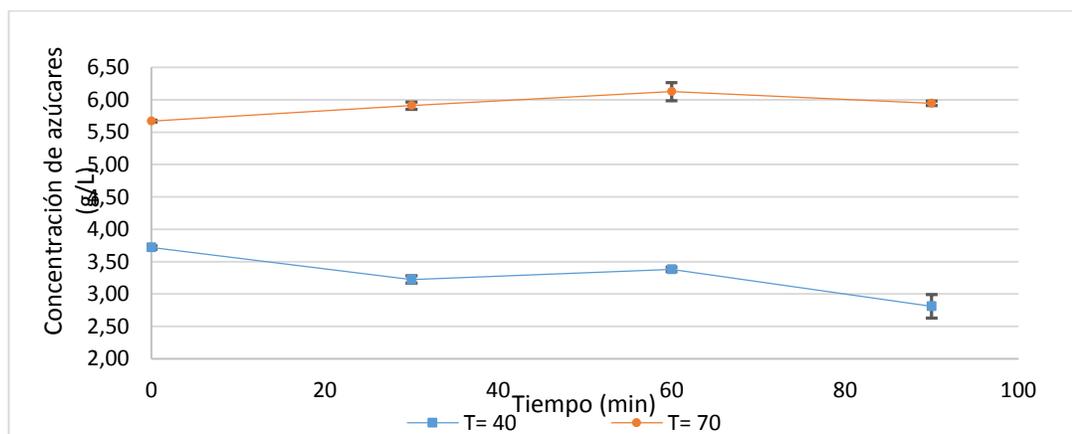


Fuente: elaboración propia.

Se concluye, que las condiciones más favorables con este tipo de hidrólisis son a una concentración de 1% de NaOH, a una temperatura de 40°C y con un tiempo de exposición de la cáscara en la base de 0 minutos dada la alta concentración de azúcares solubles obtenidos y por tal comportamiento y la degradación de los azúcares en el tiempo, se consideró realizar la extracción con agua.

2.2.4.2 Extracción a base de agua. En la gráfica 5 se puede observar el comportamiento en cuanto a la concentración de los azúcares en la extracción con agua y el ANOVA obtenido es mostrado a continuación en el cuadro 3.

Gráfica 5. Cinética de extracción con agua.



Fuente: elaboración propia.

Cuadro 4. ANOVA (extracción a base de agua).

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Temperaturas	3416,707	3416,707	29,666	7,709
Dentro de los grupos	460,684	115,171		
Total	3877,390			

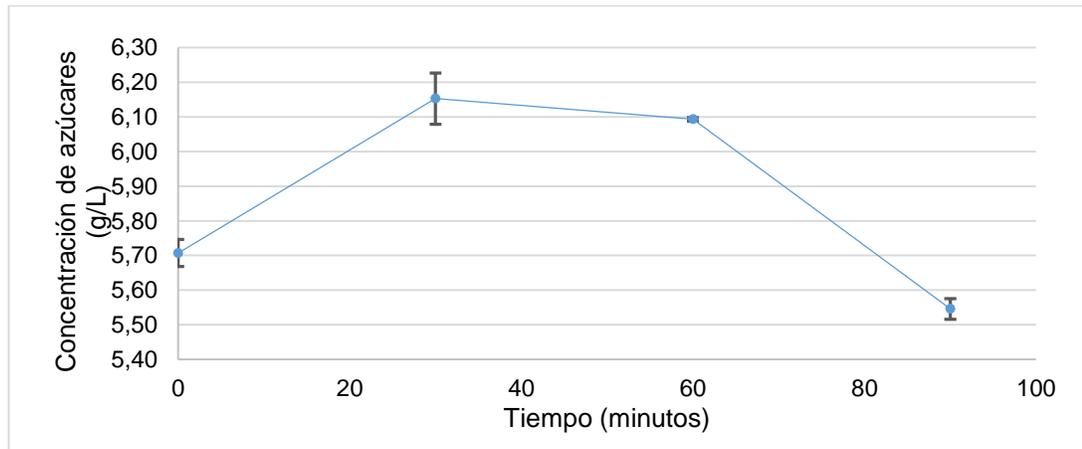
Fuente: elaboración propia.

En este caso $F > F_{critica}$ y por tanto se rechaza la hipótesis nula. Esto nos indica que el cambio de la temperatura durante la extracción a base de agua al igual que en la hidrólisis alcalina, afecta directamente la concentración de azúcares obtenida como se muestra en la gráfica 5. La extracción a base de agua presentó mejor comportamiento que el obtenido en la hidrólisis alcalina. La cinética muestra el comportamiento que se esperaba puesto que la concentración de azúcares trata de mostrarse constante con respecto al tiempo sin mostrar comportamiento de degradación alguna. Al igual que en la hidrólisis alcalina desde el tiempo cero se presenta una alta concentración de azúcares, lo que se deduce en que realmente se están liberando azúcares solubles. En este caso, el efecto del aumento de la temperatura del proceso es favorable para la extracción, ya que se obtiene mayor cantidad de azúcares a una temperatura de 70°C que a 40°C. La grafica demuestra que independientemente del tiempo al que la cáscara estuvo expuesta en el agua la concentración de azúcares extraíbles es satisfactoria puesto que tiende a mantenerse constante.

En conclusión, las condiciones más favorables para la extracción de azúcares a base de agua son a un tiempo de exposición de 60 minutos con una temperatura de 70°C.

2.2.4.3 Hidrólisis ácida. Se evaluó la concentración de azúcares extraíbles empleando la hidrólisis de tipo ácida a partir con baja concentración de ácido clorhídrico a 40°C. La cinética resultante se ilustra en la gráfica 6.

Gráfica 6. Cinética de hidrólisis acida (HCl al 0,29M).



Fuente: elaboración propia

La extracción de azúcares con la hidrólisis ácida evidenció un mejor comportamiento en comparación con la hidrólisis alcalina. En el tiempo 0 se observa una concentración alta de azúcares al igual que en los experimentos realizados en la hidrólisis alcalina por lo cual la presencia de azúcares solubles es evidente. El proceso de extracción se observa durante los primeros 30 minutos de exposición dado que luego de este tiempo empieza la disminución en cuanto a la extracción de azúcares obtenidos, por lo cual se infiere que es la degradación de los azúcares, como lo reportan Ahmad¹⁷⁴ y Dordoni¹⁷⁵, al estar más de 30 minutos expuesta la cáscara en el ácido. Se demostró igualmente una mejor extracción de azúcares que con respecto al hidrólisis alcalina; pero no es tan eficiente puesto que al igual que con el hidróxido de sodio, la concentración con respecto al tiempo tiende a disminuir con el tiempo, comportamiento contrario a obtenido con la extracción a base de agua.

Se concluye, que la hidrólisis ácida presenta resultados mucho más favorables que los obtenidos en la hidrólisis alcalina y que a pesar de ser mejor no se realizó una variación en la concentración del ácido debido al resultado obtenido, puesto que a pesar de manejar una concentración tan baja de 0.29 M los azúcares continuaron degradándose después de 30 minutos de exposición.

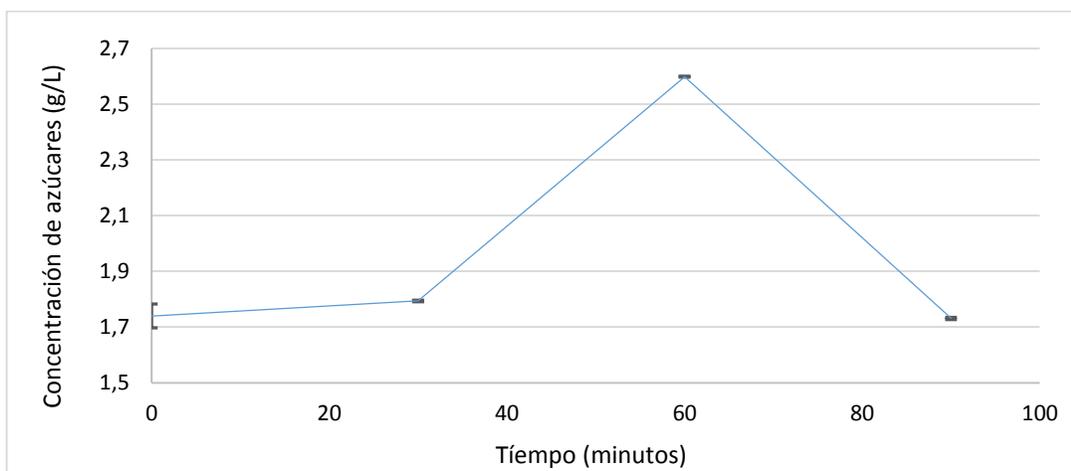
2.2.4.4 Extracción a base de agua e hidrólisis ácida. En consecuencia a que en los resultados reportados anteriormente no se logra el aprovechamiento de la cáscara en su totalidad o en su mayoría; es decir, aunque el sobrenadante obtenido

¹⁷⁴ AHMAD, Farah, *et al.* The prospect of microbial oil production and applications from oil palm biomass. *En:* Biochemical Engineering Journal. Diciembre, 2018. p. 1-52.

¹⁷⁵ DORDONI, Roberta, *et al.* Effects of an acid/alkaline treatment on the release of antioxidants and cellulose from different agro-food wastes. *En:* Waste management. 2017. p. 1-10.

en la centrifugación es rico en azúcares el precipitado restante también debe ser aprovechado en su totalidad, por lo tanto, se buscó aprovechar el precipitado de este procedimiento y se evaluó una doble extracción donde inicialmente se realizó la extracción a base de agua y posteriormente con la hidrólisis ácida ya que mostró mejores resultados que la alcalina. Se evaluaron sólo las muestras obtenidas de la segunda hidrólisis, ya que las de la primera hidrólisis corresponden a los resultados obtenidos en la gráfica 5 en la cinética a base de agua. La primera extracción fue realizada a en base de agua a 70°C y a un tiempo de exposición de 60 minutos siendo a esta temperatura y tiempo a la que se mostraron los mejores resultados obtenidos anteriormente. Luego de realizar la centrifugación se separó el precipitado del sobrenadante, y se realizó la segunda extracción al precipitado con la hidrólisis acida a los 0.29M y 40°C (gráfica 7).

Gráfica 7. Cinética de la segunda hidrólisis realizada con HCl.



Fuente: elaboración propia.

Con esta segunda hidrólisis, la cantidad de azúcares extraídos aumenta en los primeros 30 minutos de exposición y luego disminuyen drásticamente debido a su degradación al igual que ocurrió en la hidrólisis ácida anterior, por lo que se establece que este dato no presenta un comportamiento atípico, sino que obedece el comportamiento de los azúcares. Aunque se obtuvieron azúcares en la segunda hidrólisis, la concentración resultante es mucho menor que la obtenida en la primera extracción de este procedimiento con agua a 70 °C; por esto se dedujo que la mezcla de ambos sobrenadantes solo causaría una dilución de los azúcares, en vez de un aumento de estos como se pretendía demostrar.

Debido a que la mejor extracción se realizó en base de agua a una temperatura de 70 °C y en un tiempo de exposición de 60 minutos; pero por este método la cantidad de cáscara precipitada aún es significativa lo que indica que no ocurre la degradación de esta por este método de hidrólisis, además la extracción completa

de los azúcares no ocurre, sino que, aunque se puedan seguir extrayendo inclusive de la cáscara que ya se ha extraído (doble hidrólisis), estos van a seguir saliendo (cada vez en menor concentración), aun así el aprovechamiento de los azúcares fermentables de la cáscara no es completa.

A continuación, en el cuadro 4 se expone en forma general desde cual es la mejor opción en cuanto al tipo de hidrólisis, concentración, temperatura y tiempo de exposición de la cáscara en el solvente a evaluar (1) hasta la opción menos recomendable (8) teniendo en cuenta las concentraciones de azúcares obtenidas en la presenta sección.

Cuadro 5. Priorización del tipo de hidrólisis empleada para la extracción de azúcares de la cáscara de banano.

	Tipo de hidrolisis	Concentración	Temperatura (°C)	Tiempo de exposición (minutos)
1	Agua	-	70	60
2	Ácida	0.29M	40	30
3	Alcalina	1%(p/v)	40	0
4	Agua	-	40	0
5	Alcalina	2%(p/v)	40	0
6	Agua + ácido	0.29M	40	30
7	Alcalina	2% (p/v)	70	0
8	Alcalina	1% (p/v)	70	0

Fuente: elaboración propia.

Al analizar todos los experimentos realizados, se concluye que ni por la vía alcalina ni por la vía ácida se logra la liberación de azúcares fermentables. Debido a que no se encontró reportes en la literatura consultada para este tipo de residuo, no se pudo llevar a cabo una comparación. Sin embargo, distintos autores como Maset, V. *et al*¹⁷⁶, Chen, M. *et al*¹⁷⁷, Morais de Carvalho, D. *et al*¹⁷⁸ y Niño, L. *et al*¹⁷⁹ han reportado la extracción de azúcares fermentables a partir de otros tipos de biomásas residuales de tipo lignocelulosicos, tales como residuos de maíz, bagazo de caña, cascarilla de arroz, entre otros. Por otro lado, la hidrólisis a base de agua es la mejor

¹⁷⁶ MOSET, V., *et al*. Combined low thermal alkali addition and mechanical pre-treatment to improve biogas yield from wheat straw. *En: Journal of Cleaner Production*. Octubre, 2017. p. 1-28.

¹⁷⁷ CHEN, Ming; ZHAO, Jing y XIA Liming. Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *En: Journal of biomass and bioenergy*. Mayo 2009. p. 1381 – 1385.

¹⁷⁸ MORAIS DE CARVALHO, D.; DE QUIROZ, J. y COLODETTE, J. Assessment of alkaline pretreatment for the production of bioethanol from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. *En: Journal of Industrial Crops and products*. Septiembre, 2016. p. 932-941.

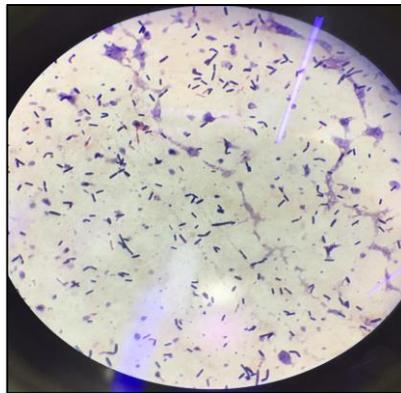
¹⁷⁹ NIÑO, Lilibeth; ACOSTA, Alejandro y ZAMBRANO, Gelves. *Op. Cit.*, p. 320

en comparación con la hidrólisis de tipo alcalina y ácida. Las mejores condiciones están dadas a una temperatura de 70°C y un tiempo de exposición de 60 minutos en cuanto al comportamiento de la cinética sin embargo también se obtuvo una alta concentración extraída con ácido clorhídrico a 40°C, 0.29M a los 30 minutos. Sin embargo, independientemente del tiempo de exposición la cantidad de azúcares solubles extraíbles tiene a ser constante con respecto al tiempo. Aun así, por este método la cantidad de cáscara precipitada aún es significativa además de no presentar una extracción completa de los azúcares. Por lo anterior, se decidió realizar el proceso fermentativo agregando el sustrato de cáscara directamente, para así, lograr el aprovechamiento al 100% de la cáscara, comprobar si existe toxicidad alguna de las cáscaras que puedan afectar a las bacterias e identificar si las bacterias tienen la capacidad de degradar la cascara.

2.2.5 Comprobación del proceso fermentativo. En esta sección se confirmó la supervivencia de las bacterias, así como el crecimiento de estas en medios de cultivo con cáscara de banano.

2.2.5.1 Visualización de la cepa. En la ilustración 6 se observa la imagen resultante de la tinción de Gram proporcionada por el microscopio una vez realizada la tinción.

Ilustración 6. Tinción de Gram.



Fuente: elaboración propia.

Como resultado de la tinción de Gram fue posible determinar que es positiva la supervivencia de las *Clostridium butyricum*. La tinción permitió obtener una población uniforme de bacilos Gram positivos dado el color azul-violeta en que tornó la muestra y adicionalmente se corroboró la pureza de la cepa y las características físicas que presentan como se reporta en las generalidades teóricas de la sección 1.5. Las bacterias Gram positivas contienen por lo general entre 80% y 90% de peptidoglicano en su pared celular por lo tanto presenta una pared mucho más gruesa que las Gram negativas y por lo tanto no son tan permeables a los

disolventes al aplicar el alcohol/ acetona según el protocolo¹⁸⁰. Una vez obtenidos los resultados de la tinción se procedió a preparar los medios de agar básico y RCM con la cáscara para la inoculación de la cepa.

2.2.5.2 Medio sólido de agar básico. En la ilustración 7 es posible apreciar los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento de la cepa en las 4 cajas de Petri con diferente concentración de cáscara.

Ilustración 7. Medios en agar básico.



Fuente: elaboración propia.

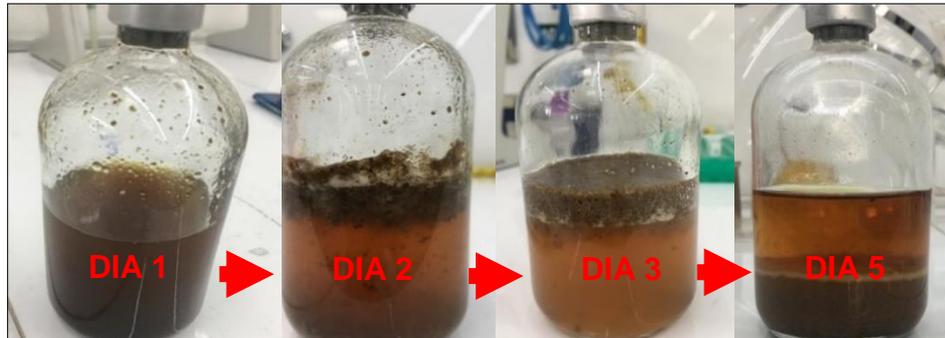
En ilustración se aprecia que el crecimiento de las bacterias fue positivo para todos los medios de cultivo preparados independientemente de la concentración de la cáscara. Las bacterias tuvieron un periodo de crecimiento durante 4 días demostrando así que la supervivencia y adaptación al medio de la cepa es posible bajo cualquiera de las 2 concentraciones de cáscara mostrándose un mejor resultado para los medios con concentración del 5% como se puede observar en la ilustración anterior. Por lo tanto, es posible concluir que las cáscaras no son tóxicas para las bacterias.

2.2.5.3 Medio líquido en RCM. El crecimiento de las bacterias en medio líquido RCM fue conseguido. Es posible inferir que una vez hecha la inoculación en el día 1 el periodo de latencia fue básicamente de algunas horas lo cual indica una buena adaptación de las bacterias en el nuevo medio inoculado. A diferencia del medio en agar básico, el crecimiento de la cepa fue mucho más acelerado puesto que con un lapso de 24 horas en el día 2 la cepa ya se encontraba en etapa exponencial y la población se duplica por unidad de tiempo es evidente la producción de gas resultante del crecimiento, además se observa la degradación de la cáscara banano en cuanto a la pérdida de peso provocando así el ascenso de la cáscara a la superficie del medio junto con la pérdida de la intensidad del color de la cáscara con la que inicialmente se preparó el medio. En el día 3 se comenzó a apreciar que el comportamiento de la cáscara cambio, esta comenzó a descender poco a poco; es posible la disminución en cuanto a cantidad de algún recurso en el medio o

¹⁸⁰ YAZDANKHAN, S.; et al. Use of magnetic beads for Gram staining of bacteria in aqueous suspension. En: Journal of Microbiological Methods. September 2001. p. 369-371.

compuesto esencial para las bacterias e inclusive que los carbohidratos y nutrientes esenciales que son proporcionados por la cáscara se hayan agotado, también es posible la acumulación de residuos tóxicos o subproducto generados puede causar la inhibición en el crecimiento de la bacteria; indudablemente la bacteria entro en fase estacionaria por un periodo de 2 días. Finalmente, en el día 5 la cáscara se encontraba nuevamente en la base del vial lo que indica que las bacterias no lograron la degradación por completo de la cáscara de banano además el medio queda sin nutrientes y las células viables entran en la fase de muerte disminuyendo su población de forma progresiva, para asegurar lo estimado, el vial fue dejado por 3 días más y el comportamiento del medio en el vial fue el mismo como se observa en el día 5. En la ilustración 8 se observan imágenes que muestran la transición del proceso del crecimiento de las bacterias en RCM.

Ilustración 8. Medio preparado en RCM con cáscara de banano.



Fuente: elaboración propia.

Aunque la cepa utilizó la cáscara, esta no fue degradada completamente; sin embargo, el crecimiento y adaptación de la cepa en medio tanto sólido como líquido con la cáscara fue positivo. Dado que los resultados previos obtenidos fueron satisfactorios, se realizaron ensayos de fermentación para la recolección del gas, variando la concentración de cáscara y teniendo en cuenta las cinéticas del proceso.

2.2.6 Fermentación a escala laboratorio. Se procedió a realizar la fermentación a escala laboratorio, y se analizaron los resultados obtenidos para establecer los mejores parámetros para el escalamiento.

2.2.6.1 Pre-inoculación. Debido a que las bacterias se encontraban en un medio de cultivo viejo (ilustración 9, imagen izquierda), previo a la inoculación, fue necesario la activación de la cepa con el fin de disminuir el tiempo de latencia al momento de realizar las fermentaciones. El cambio de turbidez y el color opaco en qué torno el medio como se puede apreciar, indicaron que efectivamente se había logrado la activación de la cepa (ilustración 9, imagen derecha) a las 24 horas tal y

como lo reporta Malagón, D. *et al*¹⁸¹. El conteo celular se realizó por cámara de Neubauer y una vez realizada la pre inoculación se obtuvieron $1,6 \times 10^8$ células viables/ml.

Ilustración 9. Medio original y pre inculo.



Fuente: elaboración propia.

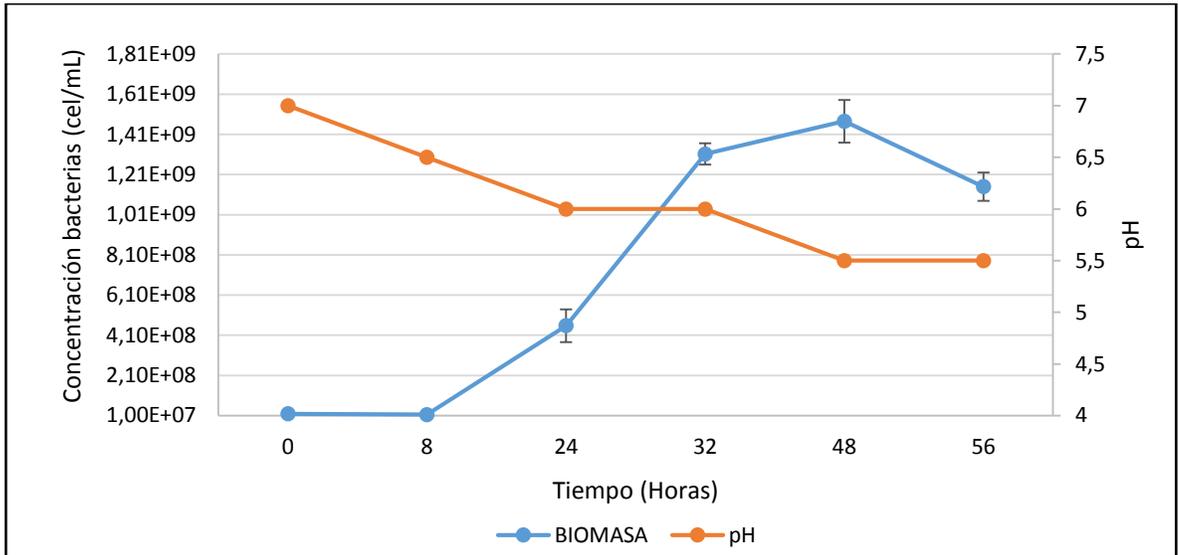
2.2.6.2 Inoculación. Una vez activada la cepa se procedió a realizar la inoculación con las células procedentes del pre inóculo en los medios de cultivo de RCM con concentraciones de 0%, 2.5% y 5% de cáscara de banano cada uno realizado por duplicado. La inoculación se realizó transfiriendo 1.9×10^7 células viables iniciales/ml, resultado obtenido en el conteo realizado por cámara de Neubauer (BOECO BOE01); Alfonso, F. *et al*¹⁸² reportan un valor de $1,7 \times 10^7$ de células iniciales para iniciar la fermentación.

2.2.6.3 Cuantificación de la biomasa y medición de ph a escala laboratorio. El crecimiento celular durante la fermentación a 0% de cáscara de banano se muestra en la gráfica 8, donde se evidencia el cambio de la biomasa a través del tiempo. Igualmente, se ven los resultados obtenidos con respecto a la medición del pH en el medio a lo largo de los procesos fermentativos. La misma información es proporcionada por la gráfica 9 pero para la fermentación al 2.5% y por último la gráfica 10 corresponden a los resultados proporcionados por la fermentación al 5%.

¹⁸¹ MALAGÓN, D.; LADINO, A. y JÁUREGUI, M. The effect of the initial concentration of glycerol on the hydrogen produced by strains of the genus *Clostridium* spp. En: International journal of sustainable engineering. Octubre, 2017. vol. 10. p. 2.

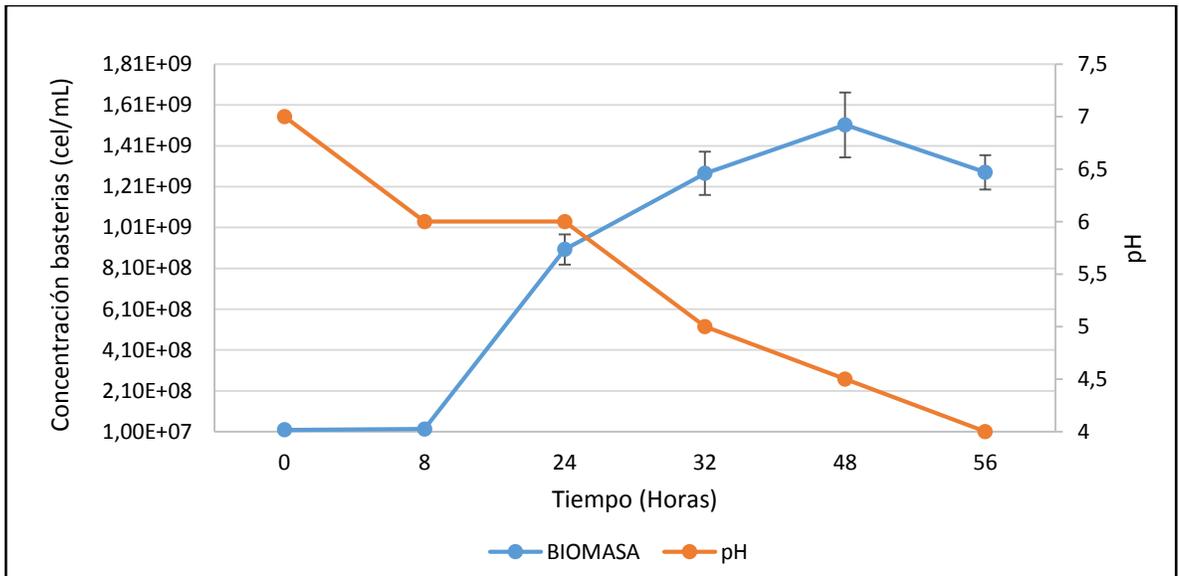
¹⁸² ALFONSO, Freddy. *et al*. Op, cit, página 20 .

Gráfica 8. Crecimiento bacteriano y medición de pH al 0% cáscara de banano.



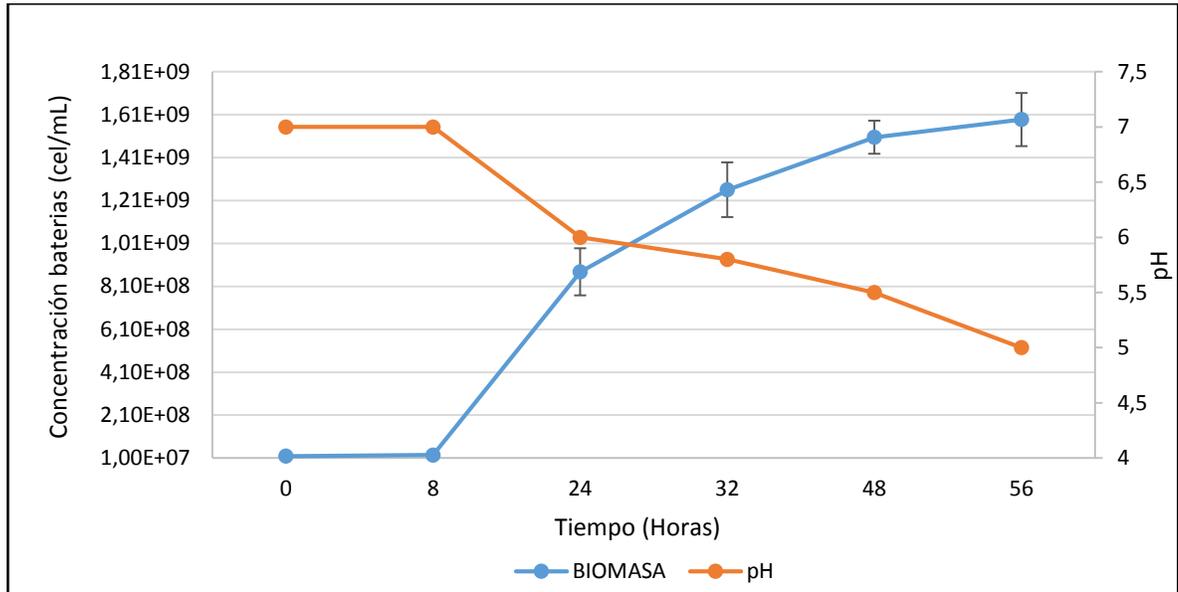
Fuente: elaboración propia.

Gráfica 9. Crecimiento bacteriano y medición de pH al 2,5% cáscara de banano.



Fuente: elaboración propia.

Gráfica 10. Crecimiento bacteriano y medición de pH al 5% cáscara de banano.



Fuente: elaboración propia.

Por medio de las gráficas es posible concluir que las diferentes etapas del crecimiento poblacional microbiano son similares entre sí, independientemente de la concentración de cáscara de banano. La etapa de latencia para los tres ensayos es de 8 horas y es de destacar que a las 48 horas el crecimiento de la biomasa fue mejor para los medios con la presencia de cáscara de banano que en el ensayo de control (al 0% de cáscara). Esto puede ir relacionado a que la cepa degrada la cáscara de banano y por tanto el crecimiento de la cepa en los medios con cáscara fue mayor porque existe mayor cantidad de sustrato en el medio que en el medio sin cáscara (0%). En el medio con 5% de cáscara de banano se logra ver que luego de 56 horas no se aprecia ni la fase estacionaria ni la fase de muerte como en los otros dos medios evaluados, por lo cual, la cepa continúa en etapa exponencial, este comportamiento difiere al reportado por Fang¹⁸³ donde la fase de muerte empieza luego de las 20 horas, sin embargo, este crecimiento es reportado a partir de glucosa adicionada directamente; no fue posible realizar una comparación debido a que no se encuentra una cinética de *Clostridium butyricum* a partir de cáscara de banano. En la tabla 11, se muestran las constantes de velocidad calculadas por medio de la ecuación 11.

¹⁸³ FANG, Herbert; ZHU, Huguang; ZHANG, Tong. Phototrophic hydrogen production from glucose by pure and co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides*. En: International journal of hydrogen energy. Junio, 2006. vol. 31. p. 2223-2230.

Tabla 12. Contantes de velocidad de crecimiento en los intervalos de tiempo.

Intervalo de tiempo (horas)	Constante (Cel/mL· H)
0 - 8	625.000
8 - 24	53'343.750
24 - 32	47'812.500
32 - 48	15'312.500
48 - 56	10'312.500

Fuente: elaboración propia.

Sin embargo, al irse acercando a la hora 56, el número de células viables, aunque sigue aumentando crece con menor velocidad, como se ve en la tabla 11 donde la constante de velocidad disminuye en el periodo de 48 a 56 horas, por lo que se infiere que está aproximándose la fase estacionaria. Es importante resaltar, que para el medio de cultivo con concentración del 0% de cáscara se evidencia una etapa exponencial de 14 horas entre las 8 y 32 horas, dos horas menos según lo reportado por Alfonso Freddy¹⁸⁴, donde evalúan la cinética de las bacterias *Clostridium butyricum* en medio RCM con una etapa exponencial de 18 horas. A diferencia de los medios de cultivos con cáscara de banano, se evidencia que la etapa exponencial es mucho más prolongada, aproximadamente de 16 horas más, esto se puede atribuir a la cáscara de banano adicionada como sustrato puesto que la cepa no se limitará únicamente con los nutrientes proporcionados por el medio, sino también con lo que le proporciona la cáscara.

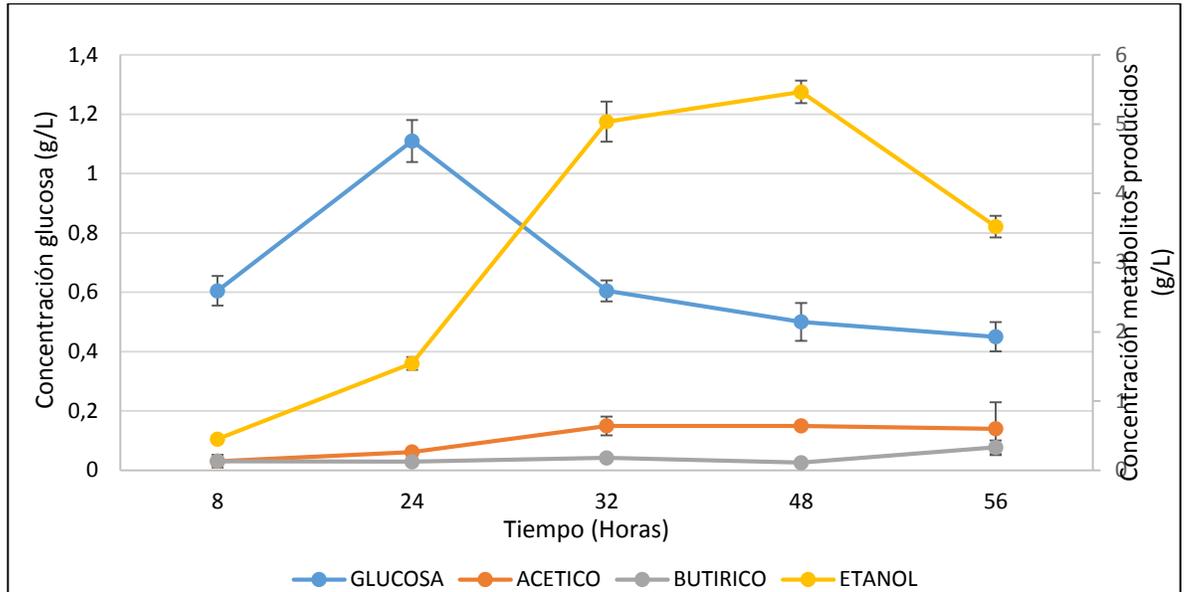
Adicionalmente se observa el comportamiento del pH durante el proceso; este parámetro fue disminuyendo por la acidificación del medio debido a la formación de ácidos grasos, por lo tanto, su monitoreo fue un indicador de que los procesos fermentativos se estaba dando de manera satisfactoria. Es importante destacar que hubo mayor acidificación en los medios con cáscara de banano que en el medio sin cáscara. Sin embargo, los valores del pH obtenido en las últimas muestras tomadas en todos los medios se encuentran dentro de un rango de 4,5 a 5.5 tal y como lo reporta Kanchanasuta, Suwimon; *et al.*¹⁸⁵, que a este rango de pH comienza la inhibición del crecimiento bacteriano para las *C. butyricum*.

2.2.6.4 Determinación de solventes/ácidos grasos y consumo de sustrato. Los resultados reportados por la cromatografía líquida muestran los metabolitos producidos durante las fermentaciones. Se encontró la formación de ácido acético, ácido butírico y glucosa. En las gráficas 11, 12 y 13 se muestran los resultados reportados con respecto al tiempo.

¹⁸⁴ ALFONSO, Freddy. *et al.* Op, cit, página 32.

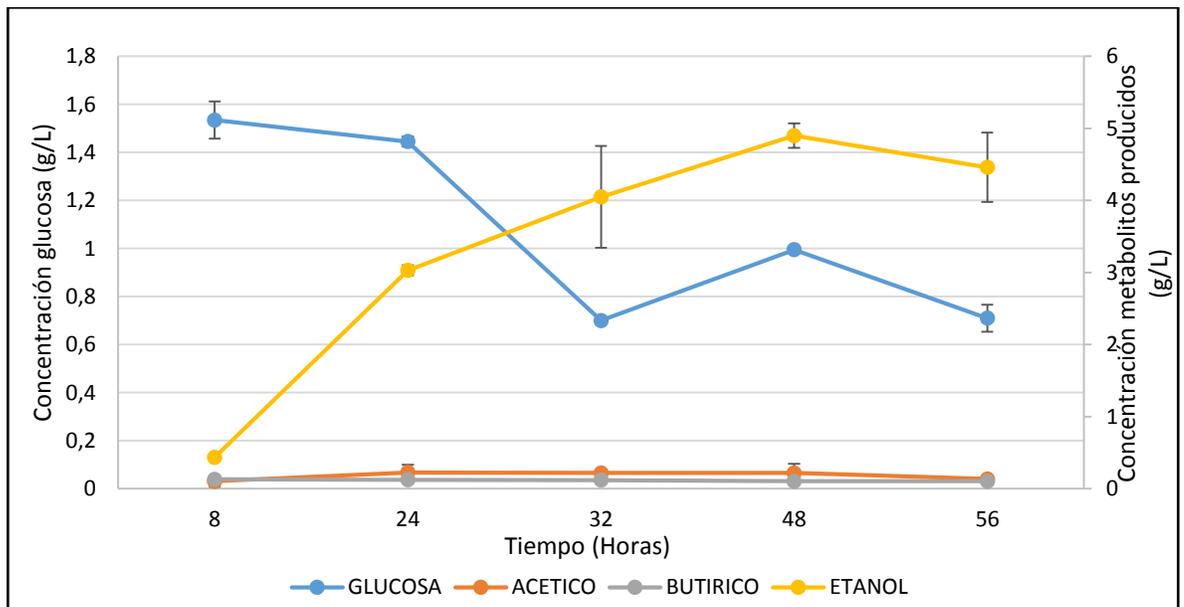
¹⁸⁵ KANCHANASUTA, Suwimon; *et al.* Op. Cit., p. 3460.

Gráfica 11. Consumo de sustrato y metabolitos al 0% de cáscara.



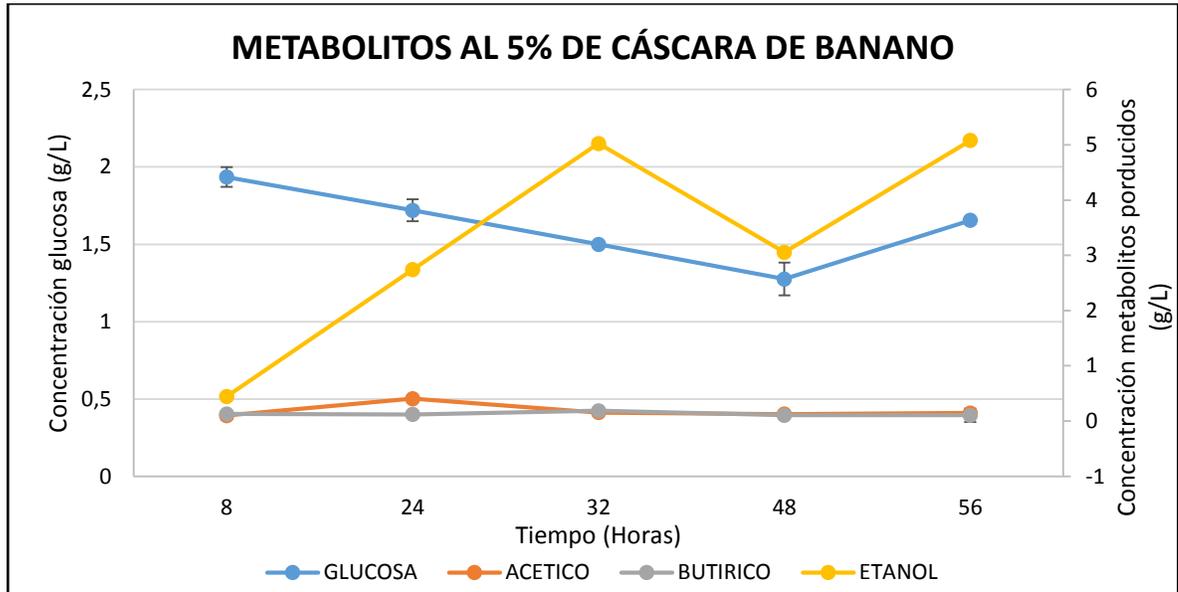
Fuente: elaboración propia.

Gráfica 12. Consumo de sustrato y metabolitos al 2,5% de cáscara.



Fuente: elaboración propia.

Gráfica 13. Consumo de sustrato y metabolitos al 5% de cáscara.



Fuente: elaboración propia

Dentro de los metabolitos producidos durante todas fermentaciones realizadas evidentemente se encontró la presencia etanol, ácido acético y ácido butírico tal y como lo reportan Malagón, D. *et al*¹⁸⁶, Zhanga, H. *et al*¹⁸⁷ y Beckers, L.¹⁸⁸, metabolitos típicos producidos por *Clostridium butyricum*. Es posible observar en las gráficas que la producción de estos metabolitos microbianos solubles tiene cierta variación con respecto a la concentración de cáscara de banana en el medio.

De acuerdo con las gráficas que muestran las cinéticas de la medición del pH, la disminución de este factor se relaciona directamente con la producción de ácidos; esto es porque, *Clostridium butyricum* presenta una fase acidogénica en la cual toman los compuestos del medio y los convierten en ácidos orgánicos durante el proceso fermentativo provocando la acidificación del medio¹⁸⁹ por tanto, un pH ácido como se obtuvo es una condición que favorece la producción de ácido acético y butírico como se está reportando. Esto es comparable con Jauregui, M. *et al*¹⁹⁰ y

¹⁸⁶ MALAGÓN, Dionisio. *et al.* Op. cit. p. 1

¹⁸⁷ ZHANG, H., BRUNS, M. y LOGAN, B.. Biological Hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. En: Water Research. Enero, 2009. p. 728-734.

¹⁸⁸ BECKERS, Laurent. *et al.* Op. Cit. p. 542.

¹⁸⁹ SÁNCHEZ, Jesús. Optimización de la agitación de un digestor anaerobio mediante mecánica de fluidos computacional. España, Madrid. Universidad Politécnica de Madrid. 2016. Página 13.

¹⁹⁰ JAUREGUI, Manuel y MAHECHA, Erika. Evaluación de un biorreactor escala laboratorio para la producción de hidrógeno a partir de *Clostridium spp* utilizando glicerol como fuente de carbono. Tesis de pregrado. Bogotá D.C.: Fundación Universidad de América. 2015. p. 117.

Bernal, M. *et al*¹⁹¹, quienes mostraron los mismos ácidos formados a partir de la misma cepa trabajada con pH inicial de 7. Sin embargo, durante las 56 horas monitoreadas la producción de ácido acético y ácido butírico es baja mientras que la producción de etanol si es significativa. Esto se debe a que la fermentación llegó a la fase solventogénica¹⁹², donde se transformaron el ácido acético y butírico producidos en la fase acidogénica en este metabolito y por tanto la concentración obtenida de estos es baja, puesto que en comparación con lo reportado por Masset, J.¹⁹³, obtiene concentraciones de 9.2 M y 16.58 M de ácido acético y ácido butírico respectivamente utilizando glucosa como sustrato. Adicionalmente, con la concentración obtenida de estos ácidos y el etanol al no alterarse significativamente, se concluye que son metabolitos primarios. Esto sugiere que el tiempo de fermentación podría ser menor para mejorar la producción de los ácidos. También es importante destacar que la generación de estos metabolitos microbianos solubles es independiente de la concentración inicial de sustrato empleada¹⁹⁴.

En las gráficas también es posible apreciar que el consumo de sustrato es notorio. Con estos resultados, se evidencia que el crecimiento celular se asocia con el consumo de sustrato independientemente de la concentración de cáscara de banano en el medio. Entre las 8 y 32 horas para el medio con concentración de 2.5% de cáscara y entre las 8 y 48 horas para el medio con concentración al 5% de cáscara se observa la disminución en la concentración de glucosa, sin embargo, en la hora en 48 con 2.5% de cáscara y en la hora 56 con 5% de cáscara se evidencia el aumento en la concentración de cáscara de banano. Esto se atribuye a los azúcares solubles proporcionados por la cáscara y la capacidad de la cepa de degradarla para emplearla como fuente de carbono.

2.2.6.5 Determinación de hidrógeno. La concentración de hidrógeno producido se evaluó con respecto al tiempo y a las concentraciones de cáscara de banano seleccionadas a evaluar. La concentración de hidrógeno durante el proceso fermentativo al 0%, 2,5% y 5% de cáscara de banano se muestra en la gráfica 14. En el anexo E se muestra el cromatograma correspondiente a la mejor concentración de hidrógeno obtenida para cada concentración de cáscara de banano.

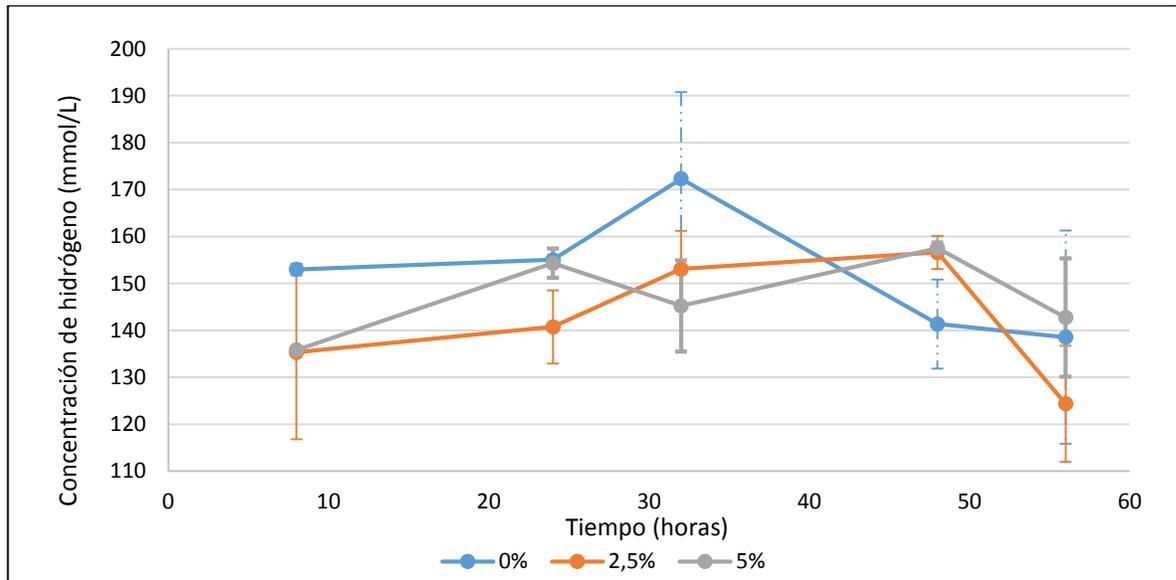
¹⁹¹ BERNAL, M., *et al*. Evaluating Colombian Clostridium spp. Strains hydrogen production using glycerol as substrate. En: Electronic Journal of Biotechnology. Marzo, 2015. p. 4.

¹⁹² MEDINA, Yuliana. Evaluación de la concentración de *clostridium acetobutylicum* ATCC 824 para la producción de butanol a partir de glucosa. Trabajo de grado microbiólogo industrial. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencia. 2013. p. 13-14.

¹⁹³ MESSET, J. *et al*. Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium* spp.. En: Biotechnol Biofuels. Mayo, 2012. p. 1-15.

¹⁹⁴ JAUREGUI, M., Op. cit. p. 52.

Gráfica 14. Producción de hidrógeno a escala laboratorio.



Fuente: elaboración propia.

Los resultados muestran que efectivamente las cepas *Clostridium butyricum* tiene la capacidad de producir hidrógeno, lo cual corrobora la ruta metabólica empleada por dicha cepa.

Durante la etapa de latencia y exponencial o de crecimiento de la cepa como se expuso anteriormente, se identifica un aumento progresivo de la concentración de hidrógeno para todos los medios independientemente de la concentración de cáscara. Por tanto, como se puede apreciar, el mayor aumento en la concentración del hidrógeno producido sucede entre las 0 y 32 horas para el medio con 0% de cáscara de banana y para las 0 y 48 horas que corresponden a los medios de 2.5% y 5% de cáscara. Por lo tanto, se concluye que el hidrógeno corresponde a uno de los metabolitos primarios durante el proceso fermentativo. Es importante resaltar que cuando la concentración de hidrógeno llega a su máximo valor esta comienza a disminuir y no tiende a mantenerse constante con respecto al tiempo.

La mejor concentración de hidrógeno obtenida fue de 172.31 mmol/L en el medio de cultivo con 0% de cáscara de banana a las 32 horas. Con un menor valor, las mejores concentraciones de hidrógeno obtenidas con los medios al 2.5% y 5% de cáscara fueron de 156.61 mmol/L y 157.54 mmol/L respectivamente a las 48 horas, que comparado con Jauregui, M., *et al*¹⁹⁵ la concentración de hidrógeno es más baja dado que obtuvo una concentración de 430 mmol/L empleando glicerol como

¹⁹⁵ JAUREGUI, M., Op. cit. p. 54.

sustrato y Messet, J., *et al*¹⁹⁶ una concentración de 970 mmol/L empleando glucosa como sustrato. En el cuadro 5 es posible observar desde cual es la mejor opción (1) a la opción menos favorable (3) en cuanto a las concentraciones de hidrógeno obtenidas por la variación de la concentración de la cáscara en el medio.

Cuadro 6. Priorización en cuanto a la concentración de cáscara con respecto a la determinación de hidrógeno.

	Concentración de cáscara (%)	Concentración de h ₂ obtenida (mmol/L)	Tiempo (minutos)
1	0	172.31	32
2	5	157.54	48
3	2.5	156.61	48

Fuente: elaboración propia.

Por tanto, es posible afirmar que efectivamente hay diferencia alguna en los medios con presencia de cáscara y en el medio sin ella. Además, que las concentraciones máximas de hidrógeno obtenidas fueron muy similares para los medios con presencia de la cáscara de banano.

2.2.6.6 Degradación de la cáscara. En el cuadro 6, se muestran los pesos de cáscara al inicio y final de la fermentación para cada muestra, así como la degradación de la cáscara y su respectiva desviación estándar.

Cuadro 7. Degradación de la cáscara a escala laboratorio.

Concentración cáscara (%)	Peso inicial de cáscara (g)	Peso final de cáscara (g)	Sólidos totales (%)	Degradación (%)
2.5	0,25	0.2343±0.0051	92,28±2.88	7.72±2.88
5	0,5	0.30885±0.0061	60.88±1.73	29.12±1.73

Fuente: elaboración propia.

Con respecto a la degradación de la cáscara, se presentaron mejores resultados en el medio de cultivo con concentración del 5% de cáscara de banano en comparación con los medios de cultivo al 2.5% de cáscara de banano. Esta degradación tan baja puede ser atribuida al tipo de sustrato empleado y a la incapacidad de la cepa para activar su maquinaria metabólica para la degradación del mismo, principalmente

¹⁹⁶ MESSET, J. *et al*. Op. cit. p. 13.

debido a la presencia de lignina¹⁹⁷. Sin embargo, los resultados obtenidos en el escalamiento a 2.5 L muestran que la baja degradación se debió a la falta de agitación, por cuanto los ensayos se realizaron en una incubadora y no en un shaker.

En conclusión, la mejor condición corresponde al ensayo con concentración del 5% de cáscara de banano; esta condición fue la seleccionada para el posterior escalamiento ya que fue el medio en el cual se logró la mayor degradación de cáscara de banano.

¹⁹⁷ HO, Kuo-Ling; CHEN, Yu-You y LEE, Duu-Jong. Biohydrogen production from cellobiose in phenol and cresol-containing medium using *Clostridium* sp. R1. En: International Journal of Hydrogen energy. Julio, 2010. p. 10239-10244

3. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES ADECUADAS PARA EL ESCALAMIENTO

Una vez establecidas las condiciones a trabajar para la fermentación a escala laboratorio es necesario la identificación de los parámetros del biorreactor al que se pretende realizar el escalamiento. En el presente capítulo se exponen las especificaciones, sistema de conexión y proceso del bioreactor a emplear para el escalamiento al igual que la identificación y selección de parámetros apropiados para el control de la fermentación teniendo en cuenta el nuevo volumen a trabajar.

3.1 ESPECIFICACIONES DEL BIOREACTOR

Para evaluar la producción de hidrógeno a una mayor escala, las características y condiciones de trabajo del bioreactor deben estar establecidas previo a realizar la fermentación. Por esta razón, en esta sección se especificarán los equipos, accesorios y modo operativo del bioreactor que deben ser tenidos en cuenta para el posterior escalamiento. El bioreactor fue propuesto y desarrollado por el semillero de investigación de Energía y Termo-fluidos de la Universidad Santo Tomás y por tanto la información suministrada a continuación es otorgada y autorizada por el instituto, la ubicación del equipo se encuentra en las instalaciones de dicha institución.

3.1.1 Características generales. El bioreactor a utilizar en el presente proyecto cuenta con un cuerpo (tanque) y tapa construidos en acero inoxidable 316L. El volumen, altura diámetro y espesor de la lámina de acero del tanque se encuentra especificados en la tabla 12.

Tabla 13. Medidas del bioreactor

Característica	Valor
Volumen del reactor (L)	7
Altura (cm)	20,73
Diámetro (cm)	20.73
Espesor (mm)	3

Fuente: elaboración propia.

3.1.2 Equipos y accesorios complementarios. El sistema de operación está dado por varios equipos y accesorios que hacen parte del funcionamiento del sistema del bioreactor en general. Los equipos y accesorios complementarios se encuentran inventariados en la tabla 13.

Tabla 14. Equipos y accesorios del bioreactor

Equipo /accesorio	Cantidad
Agitador mecánico	1
Motoreductor	1
Bomba	1
Termostato	1
Válvula de alivio	1
Chaqueta de calentamiento	1
Turbina de disco (<i>Rushton</i>)	2
Manómetro	1
Resistencia eléctrica	3
Válvulas	3
Placa deflectora	3

Fuente: elaboración propia.

El tipo de escalamiento al cual pertenece un reactor depende de su volumen de trabajo. Para el presente proyecto, la escala banco se tomó para un reactor de 2.5 litros, esto con el fin de diferenciar el volumen del biorreactor al realizado con anterioridad a una menor escala. A continuación, en la ilustración 10 se muestra el bioreactor empleado en el presente proyecto con los equipos y accesorios que ya se mencionaron.

Ilustración 10. Bioreactor



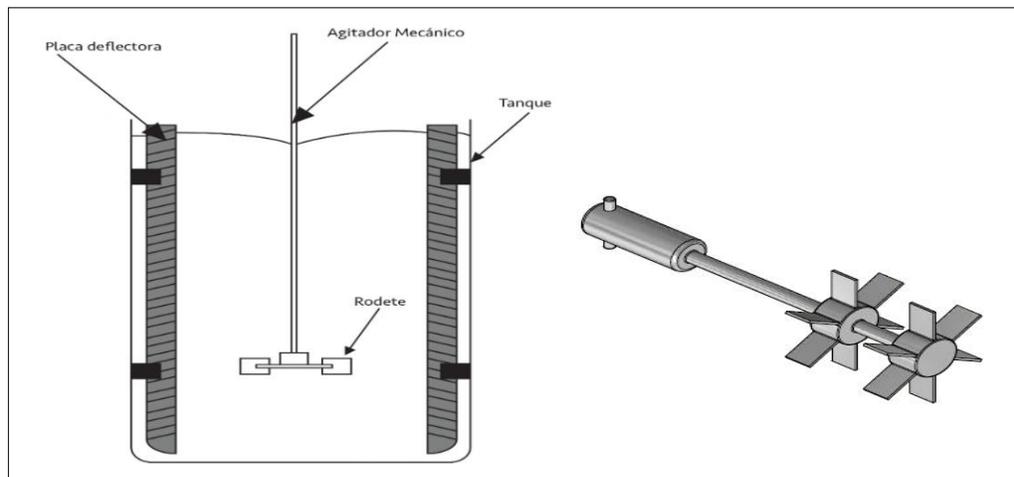
Fuente: elaboración propia.

3.1.3 Modo operativo del biorreactor. La conexión de los accesorios y los equipos ya mencionados además del modo operativo del bioreactor se encuentran explicados en la presente sección, adicionalmente se encuentra una representación esquemática de todo el sistema a trabajar en el escalamiento.

El proceso fermentativo se llevó a cabo en el tanque o cuerpo del bioreactor debidamente cerrado con la tapa por cierre mediante abrazadera. La tapa cuenta con un orificio en el centro donde se ubica el sistema de agitación, el cual consta de un motoreductor, un eje de agitación, dos turbinas *Rushton* y de tres placas deflectoras en el interior del tanque del bioreactor. El eje de agitación se encuentra ubicado de forma vertical al tanque, atravesando el orificio central de la tapa del bioreactor, este es manipulado por el motoreductor quien es el responsable del giro del eje de agitación junto con las turbinas ubicadas al otro extremo del eje. Las turbinas son de disco o también conocidas como *Rushton*, cada una de ellas tiene 6 palas en sus rodetes de forma paralela al tanque o cuerpo del equipo para crear un flujo radial en el interior. Garantizando un mejor mezclado, el bioreactor cuenta con tres placas deflectoras distribuidas internamente en el tanque, esto favorece la homogeneidad de la mezcla independiente del volumen a trabajar y provoca mayor turbulencia rompiendo el movimiento circular que producen las turbinas durante el mezclado.

En la figura 13 observa la disposición de las placas deflectoras, eje agitador y turbinas (palas) en el bioreactor.

Figura 13. Representación esquemática del sistema de agitación.

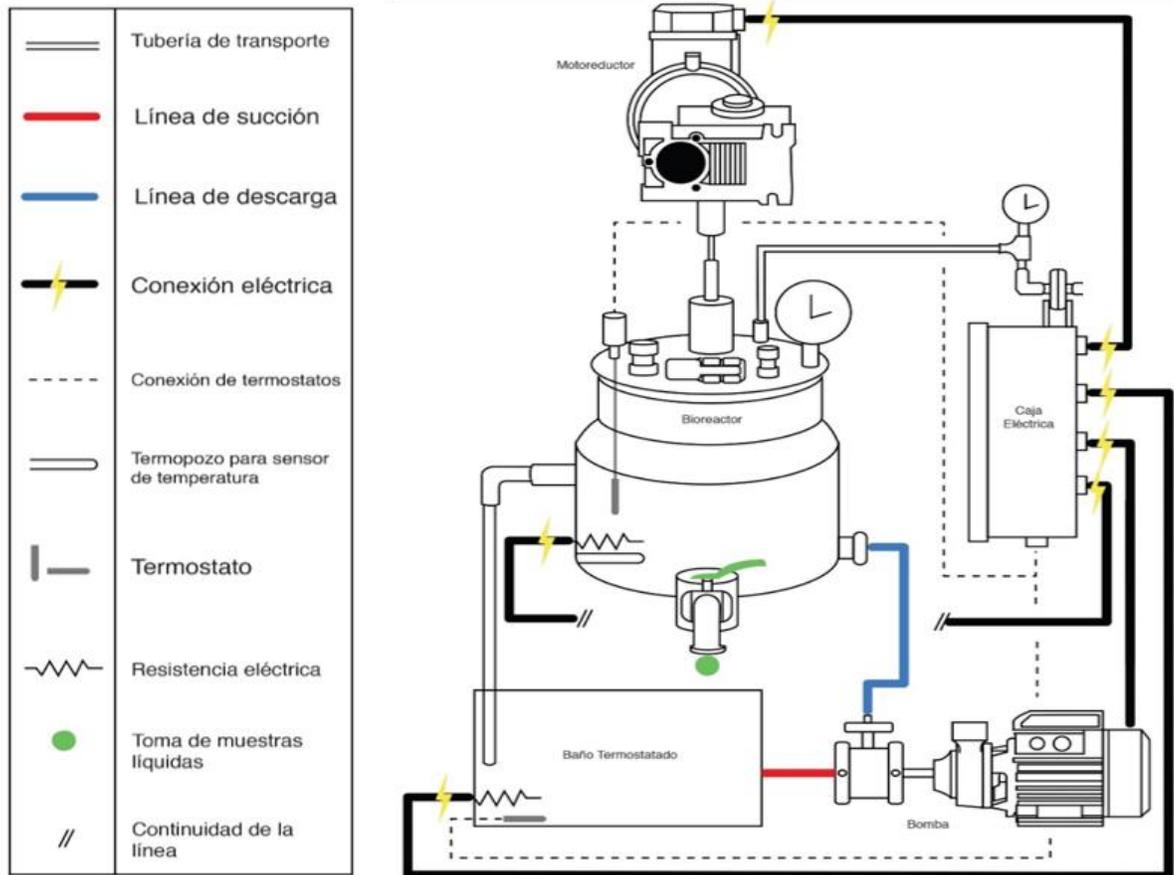


Fuente: JAUREGUI, Manuel., *et al.* Evaluación de un biorreactor escala laboratorio para la producción de hidrógeno a partir de *Clostridium spp.* utilizando glicerol como fuente de carbono. (2015). Modificada por los autores.

El control de la temperatura en el bioreactor se efectúa mediante un lazo de control cerrado por estrategia feed back. Se cuenta con un baño termostato ubicado en la parte inferior del bioreactor y una camisa o chaqueta de calentamiento que envuelve el tanque o cuerpo del equipo. El fluido que pasa desde el termostato hasta la chaqueta de calentamiento es impulsado por una electrobomba que tiene la capacidad de bombearlo de manera continua y la conexión entre sí de los equipos está dada por mangueras hidráulicas de polietileno. Por tanto, la temperatura de la mezcla en el bioreactor es proporcionada por medio del fluido que transfiere su energía en forma de calor a través de la chaqueta. El termostato comienza a calentar el fluido gracias a la conexión eléctrica que actúa sobre una resistencia de 1000 W con la que cuenta y la temperatura de trabajo deseada es ajustada por el usuario en el termostato. Cuando la mezcla comienza a calentarse, el sensor de temperatura (termómetro bimetálico) protegido por un termopozo está ubicado en el interior del bioreactor el cual es el encargado de identificar la temperatura en la cual se encuentra la mezcla (variable controlada) gracias al fluido de calentamiento se envía la señal al controlador para el ajuste de temperatura de forma automática manipulando la temperatura de calentamiento del fluido (variable manipulada) según la indicada por el usuario y de esta manera controlar la temperatura durante el proceso. Este mismo sistema de lazo cerrado y estrategia feed back, también es aprovechado para la esterilización del bioreactor a altas temperaturas dado que este también cuenta con una resistencia de 1000 W en el interior del mismo. El fluido que sale de la camisa o chaqueta de calentamiento es recirculado al termostato para ser reutilizado. También el de nivel en el termostato es controlado, esto es debido a que, si la cantidad de agua en el termostato no es la suficiente, las resistencias no calentarán el agua que pasa por la chaqueta para mantener la fermentación en el bioreactor a la temperatura que se desea.

La tapa del bioreactor cuenta con varios orificios donde se acoplan varios dispositivos al equipo para un óptimo funcionamiento y control de los procesos fermentativos. Se encuentra un manómetro que mide la presión interna durante el proceso, una válvula de seguridad y, por último, una conexión que permite la salida de la mezcla de gases producida durante el proceso. Adicionalmente el cuerpo del bioreactor cuenta con una llave en la parte inferior del equipo que facilita la toma de muestras líquidas. En la figura 14 se aprecia un esquema representativo del bioreactor.

Figura 14. Representación esquemática del bioreactor.



Fuente: JAUREGUI, Manuel. Evaluación de un biorreactor escala laboratorio para la producción de hidrógeno a partir de *Clostridium spp.* utilizando glicerol como fuente de carbono. (2015). Modificada por los autores.

3.2 PARAMETROS SELECCIONADOS PARA EL ESCALAMIENTO

Teniendo en cuenta las especificaciones del bioreactor, se evidencia que no se cumple el principio básico de escalamiento el cual es la similitud geométrica, por lo que el método de escalamiento aplicado fue el de ensayo-error, manteniendo los parámetros fijos de trabajo y los parámetros a cambiar según el nuevo volumen de trabajo a escalar.

Según lo discutido en las características generales del bioreactor el volumen es de 7L, sin embargo, con base a lo estipulado por Jauregui M. y Mahecha E.¹⁹⁸ quienes

¹⁹⁸JAUREGUI, Manuel y MAHECHA, Erika. Evaluación de un biorreactor escala laboratorio para la producción de hidrógeno a partir de *Clostridium spp* utilizando glicerol como fuente de carbono. Tesis de pregrado. Bogotá D.C.: Fundación Universidad de América. 2015. p. 76.

diseñaron y emplearon el mismo reactor para una fermentación empleando glicerol como sustrato, utilizan y sugieren un volumen efectivo menor o igual a 5 L, y por tanto se trabajó por facilidad con un volumen de 2.5 L en el bioreactor teniendo en cuenta que el sustrato a trabajar es un sólido. También, especifican las siguientes condiciones de trabajo: La esterilización del equipo se ejecuta a una temperatura de 120°C durante 20 min a una presión de 15 psig (1 bar). Debido a que el bioreactor cuenta con un sistema de agitación, especificaron que a una velocidad de agitación de 200 rpm ya que a esta velocidad, mejora tanto la productividad como el rendimiento de hidrógeno producido durante los procesos fermentativos empleando bacterias pertenecientes al género *Clostridium*^{199,200}.

La fermentación a escala laboratorio se llevó a cabo teniendo en cuenta los factores de crecimiento, ya que son las condiciones óptimas para la cepa, por tanto, las condiciones son las mismas para el proceso fermentativo a escala banco: El valor inicial de pH es de 7 y la temperatura de 37°C durante la ejecución de la fermentación. Es importante resaltar que la temperatura del fluido de calentamiento, en este caso agua, debe operar por encima de la temperatura de operación (37°C) y por tanto el termostato fue programado a 40°C para lograr la temperatura óptima de crecimiento de la cepa debido a la pérdida de calor por transporte del fluido²⁰¹. Para el proceso fermentativo en el bioreactor la composición del medio de cultivo debe ser recalculada debido al nuevo volumen de trabajo; puesto que a escala laboratorio fue de 100 ml y el volumen de trabajo del bioreactor fue de 2.5 L, se preparó únicamente 95 g de medio de cultivo RCM Merck por cada ensayo en el bioreactor. También, con base a los resultados obtenidos a escala laboratorio en el capítulo 2, se empleó una concentración de sustrato del 5% de cáscara de banano para el escalamiento y por tanto la cantidad de cáscara es de 12.5 g por cada ensayo en el bioreactor.

Una vez establecidos los parámetros a escala laboratorio y seleccionadas las condiciones adecuadas para el escalamiento, se procede a realizar el montaje en el bioreactor y analizar los resultados obtenidos a una mayor escala.

¹⁹⁹ Ibid.p.60.

²⁰⁰ YUNG-CHUNG, L., *et al.*, Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. *International Journal of Hydrogen*. 2017. p. 15815-15822.

²⁰¹ JAUREGUI, M., Op. cit. p. 74.

4. DESARROLLO DEL PROCESO FERMENTATIVO DE LA CÁSCARA DE BANANO A ESCALA BANCO

Con los resultados obtenidos del estudio previamente realizado a escala laboratorio en el capítulo 2, fue posible evidenciar que efectivamente la cáscara de banano como biomasa residual no presenta toxicidad alguna para la cepa y que así mismo es posible lograr la degradación parcial de la cáscara por parte del microorganismo durante el proceso fermentativo; adicionalmente con la adecuada selección de los parámetros de trabajo para el posterior escalamiento y teniendo en cuenta el nuevo volumen de trabajo y un mecanismo de agitación con el que cuenta el bioreactor fue posible llevar a cabo el proceso fermentativo a una mayor escala; tal y como se describe en el presente capítulo.

4.1 MÉTODOS

En esta sección, se muestra la metodología empleada para efectuar el escalamiento. Al igual que en la escala laboratorio se llevó a cabo la pre inoculación e inoculación teniendo en cuenta el nuevo volumen de trabajo de 2.5L. La cuantificación de la biomasa también fue realizada por cámara de Neubauer (BOECO BOE01)^{202,203} y el medio de cultivo empleado también fue RCM Merck. El proceso fermentativo en el bioreactor se llevó a cabo por duplicado y se midió la dispersión entre estas dos muestras por medio de la desviación estándar.

4.1.1 Pre-inoculación. Para realizar la inoculación en el bioreactor fue necesario activar las bacterias, para lo cual se prepararon 80 mL de RCM en las mismas condiciones e igual procedimiento como se expone en la escala laboratorio (capítulo 2) y se inóculo 1 ml a cada uno de los viales y se incubó a 37°C durante 24 horas con el fin de promover el crecimiento de las bacterias.

4.1.2 Medio de cultivo. Debido al nuevo volumen de trabajo, se preparó el RCM en 2,5 L de agua destilada, manteniendo una proporción de 38 g/L de RCM y una concentración de 5% de cáscara de banano. Una vez preparado el medio en el bioreactor fue necesario proceder a la esterilización del mismo.

4.1.3 Inoculación. Una vez activa la cepa transcurridas las 24 horas y esterilizado el medio en el bioreactor, se realizó la inoculación. Se transfirieron los 80 ml de RCM preparados durante la pre inoculación; esta cantidad fue inoculada para mantener

²⁰² CASTILLO, Gabriela. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Instituto mexicano de tecnología del agua, coordinación de tecnología de comunicación, participación e información, subcoordinación de editorial y gráfica. 1 ed. México, 2004. p. 90-92.

²⁰³ ARREDONDO, Bertha y VOLTOLINA, Domenico. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En: Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. México, 2007. p. 21-29.

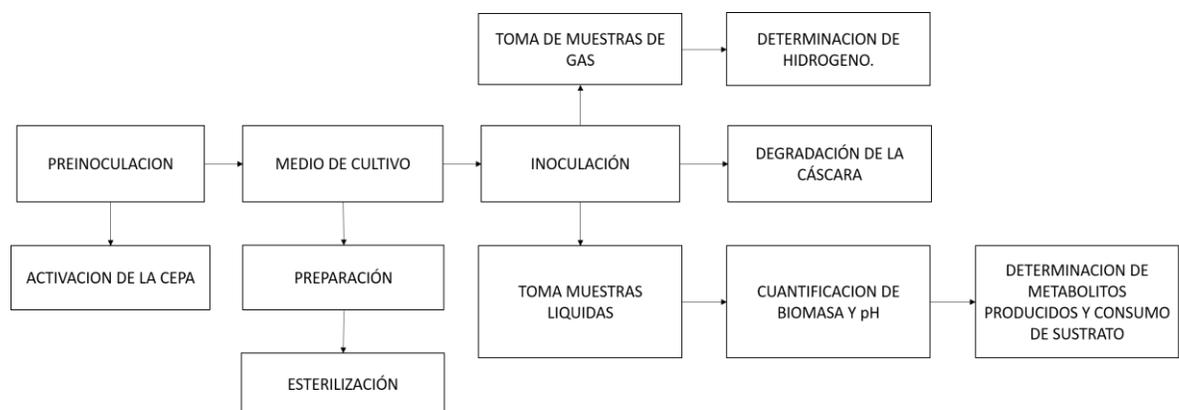
la misma proporción de células viables iniciales con las que se inició la fermentación a escala laboratorio.

4.1.4 Cuantificación de biomasa, medición de ph, determinación de solventes y ácidos grasos, consumo de sustrato y determinación de hidrógeno. La fermentación se efectuó con agitación constante. Se tomaron muestras tanto líquidas como de gas cada 4 horas durante el día; las muestras de gases fueron aseguradas con silicona alrededor de la tapa para evitar el escape y luego fueron enviadas a cromatografía de gases. Las muestras líquidas fueron depositadas en tubos eppendorf para poder cuantificar el crecimiento de las bacterias, una vez realizado el conteo, los tubos fueron centrifugados para separar el sobrenadante (metabolitos producidos) del precipitado (cáscara y biomasa) y así poder ser enviado el sobrenadante resultante a cromatografía líquida. Igualmente se llevó el control del pH durante el proceso por medio de un pHmetro (JENWAY 3520). El procedimiento llevado a cabo para la toma y análisis de muestras y equipos empleados, es el mismo que se especifica en la escala laboratorio.

4.1.5 Degradación de la cáscara. Para determinar la degradación de la cáscara durante el proceso, se tomaron muestras líquidas de 60 ml del medio cada 4 horas. Las muestras fueron sometidas a un proceso de separación por filtración al vacío empleando una bomba (GAST DOA-P704-AA), y culminada la separación, la cáscara resultante en los papeles filtro fueron llevados a un horno a 110°C durante 3 horas para eliminar la humedad. Finalmente, la cáscara resultante fue calculada por la diferencia de pesos obtenidos entre el papel filtro previo a la filtración y el papel filtro con los sólidos secos. De esta manera, se midió la degradación de la cáscara presente en el medio de cultivo a través del tiempo.

A continuación, se muestra un diagrama de proceso en la figura 15 que muestra el procedimiento general para desarrollar la fermentación a escala banco.

Figura 15. Diagrama de proceso de la fermentación a escala banco.



Fuente: elaboración propia.

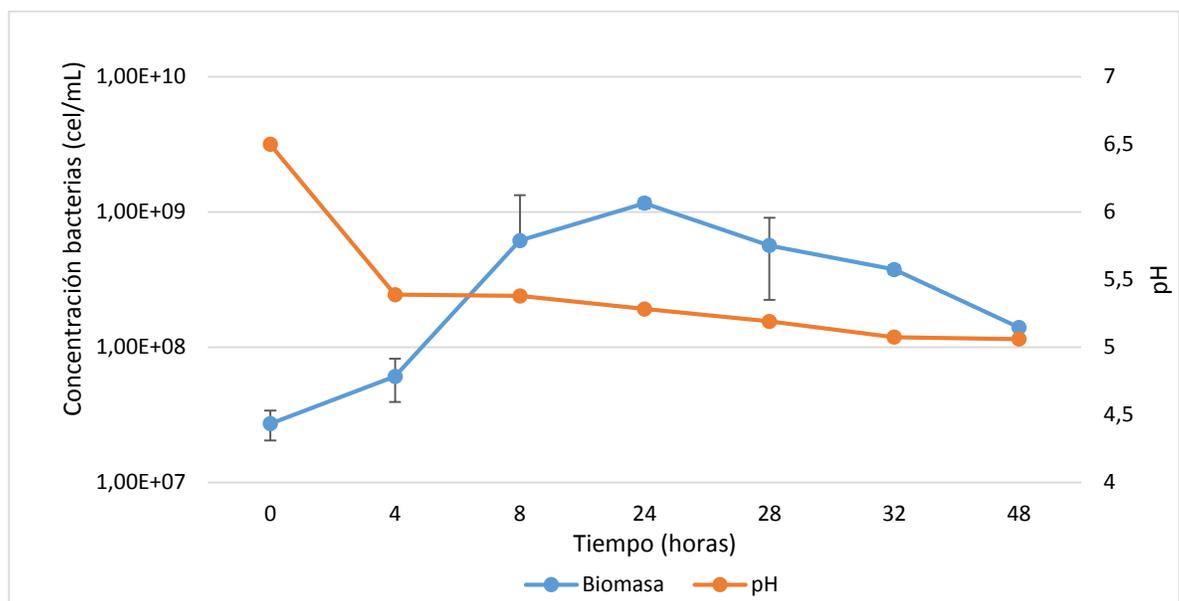
4.2 RESULTADOS

En esta sección se muestran y discuten los resultados obtenidos en cuanto a todo el proceso fermentativo ejecutado en el bioreactor.

4.2.1 Pre-inoculación e inoculación. Al igual que en la escala laboratorio, la capa fue activada e inoculada en el bioreactor con un número de células viables iniciales de $2,72 \times 10^7$ cel/m para la fermentación en el bioreactor.

4.2.2 Cuantificación de la biomasa y medición de pH. El crecimiento celular durante la fermentación se muestra a continuación en la gráfica 15 donde es posible observar que crecimiento de la cepa y la medición del pH con respecto al tiempo.

Gráfica 15. Cuantificación de la biomasa y medición de pH en el bioreactor.



Fuente: elaboración propia.

Como se puede ver en la gráfica 15 la fase de latencia de las bacterias es casi nula, en comparación con la escala laboratorio que fue de 8 horas en todos los ensayos, mientras que la fase exponencial se dio luego de 4 horas de la inoculación y duro hasta las 24 horas donde el crecimiento fue máximo ($1,16 \times 10^9$), posterior a esto empieza la fase de muerte de las bacterias; según lo reportado por Alfonso, F. *et al*²⁰⁴ quienes utilizan glucosa como fuente de carbono, la duración de las fases es similar, aunque el crecimiento máximo fue de $2,2 \times 10^9$ y se dio luego de 18 horas. Esta variación en el tiempo puede ser debido a la dificultad de las bacterias por obtener sus nutrientes a partir de la cáscara de banano. En comparación con la

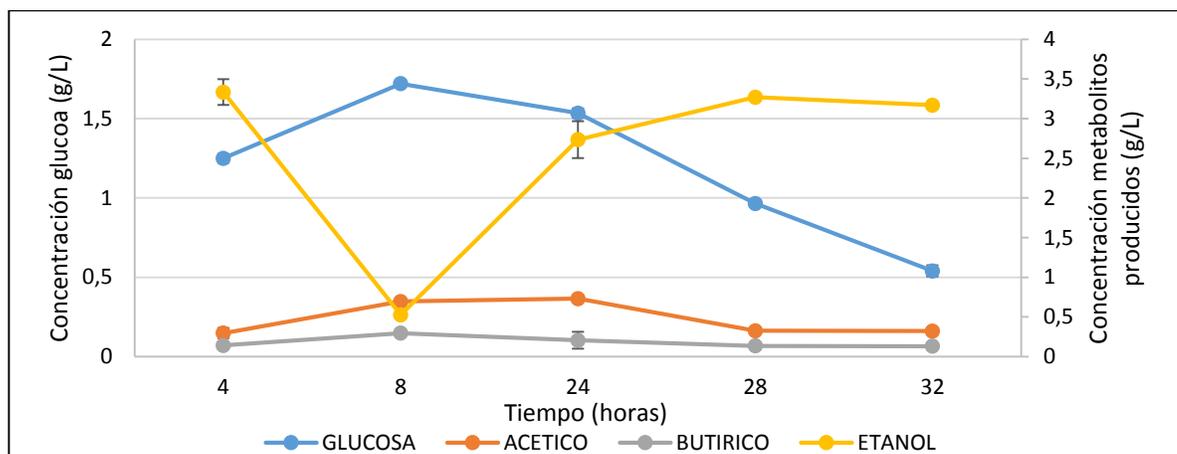
²⁰⁴ ALFONSO, Freddy, *et al.* Op, Cit., Página 32.

fermentación a escala laboratorio, la fase exponencial fue un tiempo de aproximadamente 40 horas mientras que en el reactor fue de 20 horas; a las 48 horas de fermentación en escala laboratorio se estaba iniciando la fase de muerte mientras que en el reactor esta fase inicio pasadas las 24 horas.

El medio en el reactor se acidificó en un tiempo menor al de escala laboratorio puesto que luego de 4 horas alcanzó un pH de 5.38 mientras que en los viales se obtuvo un pH entre el rango 6-7 luego de 8 horas, este comportamiento es asociado al tiempo de fase exponencial.

4.2.3 Determinación de solventes/ácidos grasos y consumo de sustrato. Con el fin de evaluar la fermentación en el reactor y del control de la fermentación se realizó una cromatografía líquida a las muestras tomadas del reactor, en la gráfica 16 se encuentran las cantidades de los metabolitos producidos.

Gráfica 16. Metabolitos líquidos producidos en la fermentación.



Fuente: elaboración propia.

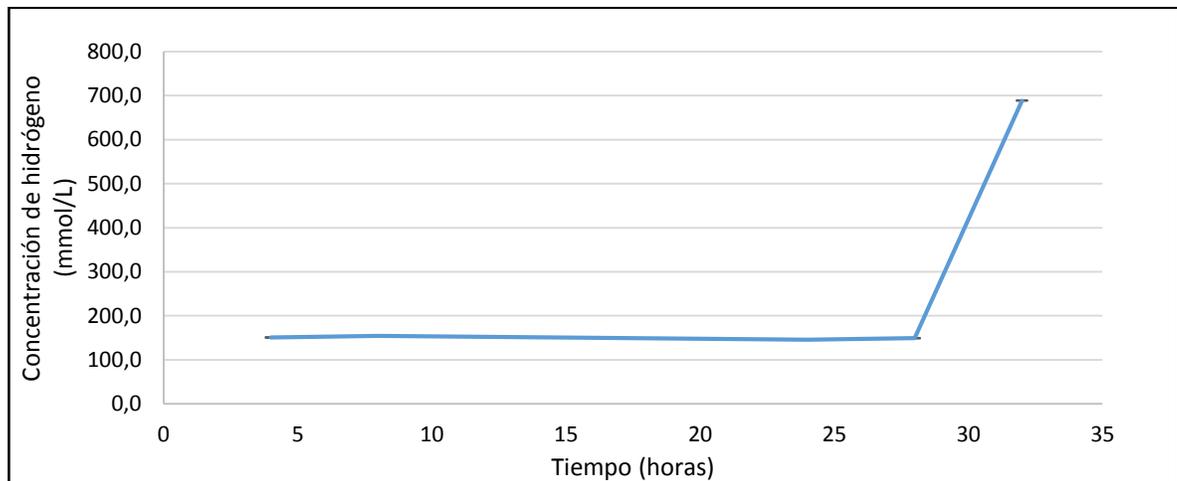
Se logra ver que la cantidad de glucosa es mayor luego de 24 horas, esto se debe a la liberación de azúcares a partir de la cáscara de banano en el medio. Igualmente, se logra ver la producción de ácido acético y ácido butírico, los cuales son productos de la fermentación de *Clostridium butyricum* en la ruta metabólica para la producción de hidrógeno. Sin embargo, se logra ver una mayor producción de ácido acético, lo que sugiere que la ruta metabólica de *Clostridium butyricum* fue por la vía de producción de acetato. La producción de etanol se debe a las condiciones anaeróbicas en que se realizó la fermentación puesto que la presencia de este producto sugiere que no se ha dado una liberación completa del hidrógeno²⁰⁵, por lo que las condiciones de fermentación usadas no fueron óptimas para la obtención del mismo. También, se observa una disminución del pH en el medio que se debe

²⁰⁵ BEDOYA, Andrea. *et al.* Op, cit, página 146.

a la producción de metabolitos por parte del proceso fermentativo de las bacterias como lo son el ácido acético y el ácido butírico²⁰⁶; estos metabolitos hacen que el medio sea ácido y por lo tanto inhibe el metabolismo de las bacterias para que continúen con la producción de hidrógeno tal y como también sucede en las investigaciones reportadas por Jauregui, M. *et al*²⁰⁷ y Giraldo, Y. *et al*.²⁰⁸

4.2.4 Determinación de hidrógeno. Con el objetivo de evaluar la producción de hidrógeno en el bioreactor se realizó una cromatografía de gases que fueron tomadas y se calculó el rendimiento, los datos obtenidos se muestran en la gráfica 17, el cromatograma obtenido para la mejor concentración de hidrógeno alcanza se muestra en el anexo F.

Gráfica 17. Producción de hidrógeno en el bioreactor.



Fuente: elaboración propia.

La producción de hidrógeno en la fermentación se presenta desde la hora 4 posteriores a la inoculación y tiene una producción constante hasta pasadas las 28 horas, donde la producción de hidrógeno aumenta significativamente a pesar de que las bacterias se encuentran en fase de muerte. Las concentraciones obtenidas son mayores que las reportadas por Bernal, M. *et al*²⁰⁹ donde la máxima producción se dio luego de 20 horas y fue de aproximadamente 11.5 mmol H₂/L, esto se puede deber a la diferencia de sustrato en el medio, debido a estos datos fueron obtenidos a partir de glicerol. Por lo anterior se podría inferir que la cáscara de banano es una fuente de carbono más favorable para la producción de hidrógeno que el glicerol.

²⁰⁶ SÁNCHEZ, Jesús. Op. Cit., Página 13.

²⁰⁷ JAUREGUI, M., *et al*. Op. Cit., Página 111

²⁰⁸ GIRALDO, Yesica y ORTIZ, María. Producción de biogas a partir de la codigestión de biomasa residual en un sistema de digestión anaerobia con agitación a escala laboratorio. Fundación Universidad de América (2018). Página 31.

²⁰⁹ BERNAL, M. *et al*. Op. cit. p. 4.

La concentración máxima de hidrógeno producido a escala laboratorio a la misma concentración de cáscara fue de 157,7 mmol/L y se dio a las 48 horas, mientras que a escala banco la concentración máxima fue de 668,4 mmol/L y se dio en un tiempo de 32 horas, esta diferencia en la concentración de hidrógeno producida y en el tiempo de producción se debe a que en el reactor se mantuvo agitación constante, mientras que en los ensayos de laboratorio no se tuvo agitación del medio de cultivo.

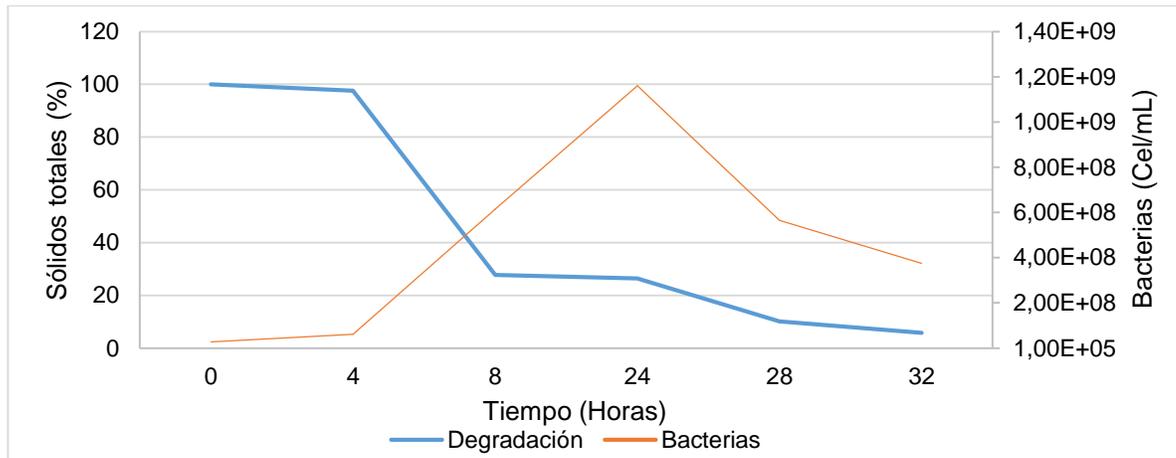
4.2.5 Degradación de la cáscara. Con el fin de comprobar la degradación de la cáscara se calculó el porcentaje de sólidos resultantes en las 6 muestras tomadas a lo largo de la fermentación en el bioreactor. Teniendo en cuenta que para el análisis de la degradación de la cáscara se tomaron 60 ml por muestra y teniendo en cuenta que la concentración inicial en el ensayo es del 5%, se tiene 0.3 g iniciales de cáscara de banano por muestra tomada. En la gráfica 18 muestra la cinética de la degradación de la cáscara en el tiempo y en la ilustración 11 se observa disminución progresiva de la cáscara a simple vista en las muestras líquidas tomadas en el bioreactor.

Ilustración 11. Sólidos totales obtenidos por muestra de cascara de banano.



Fuente: elaboración propia.

Gráfica 18. Degradación de la cáscara en el bioreactor y crecimiento celular.



Fuente: elaboración propia.

Es posible observar que para las primeras 5 horas el porcentaje de cáscara degradada es bajo, el porcentaje de degradación es del 2.47%, esto debido a que las bacterias estaban en un proceso de adaptación de su maquinaria metabólica para el consumo de este sustrato. Sin embargo, hubo crecimiento, y este se debe a la presencia de glucosa y almidón en el medio RCM. A partir de la hora 4 se inicia la degradación de la cáscara, con lo cual se dispara el crecimiento de la cepa (entre la hora 4 y 8), lo que concuerda con el tiempo de la fase de crecimiento exponencial de las bacterias.

Igualmente se logra ver que entre las 8 y 24 horas no hay un cambio significativo en la degradación a pesar que a las 24 horas es el periodo de tiempo donde hubo un mayor crecimiento en la población bacteriana, pero que coincide con la disminución de glucosa en el medio. El porcentaje final obtenido fue de 94,97% de cáscara degradada el cual es un porcentaje alto de degradación en comparación con lo obtenido por Granda²¹⁰ en el cual se logra un porcentaje máximo de degradación de cáscara de banano de 49,59%, esto se puede deber a una diferencia entre las especies de banano usado, ya que dicho autor empleó hongos, frente a las bacterias empleadas en este proyecto.

A partir de los resultados obtenidos se puede evidenciar que los residuos de *Musa Cavendish* constituyen una buena fuente de carbono para *Clostridium butyricum*, con lo cual se logra la formación de ácido butírico, acético, etanol e hidrógeno como sub-productos.

²¹⁰ GRANDA, Fabián. Obtención de azúcares fermentables por degradación fúngica de cáscara de banano (*Cavendish valery*). Trabajo de grado bioquímico farmacéutico. Loja: Universidad técnica particular de Loja, 2009. 49 p.

5. CONCLUSIONES

- La cáscara de banano presenta un porcentaje en peso seco de carbohidratos totales de 40.36% y una relación C/N de 32.82. Esta biomasa residual resulta ser un sustrato atractivo para llevar a cabo procesos fermentativos. A pesar del alto contenido de carbohidratos que presenta, la extracción de azúcares por el método de hidrólisis (alcalina, ácida o a base de agua) no es efectivo para la extracción total de estos, ya que no logra el rompimiento de la lignina, dificultando la extracción de los azúcares.
- Durante el proceso fermentativo a escala laboratorio no hubo diferencia significativa en cuanto a la producción de hidrógeno y degradación de la cáscara. A pesar de no ser significativa, la diferencia se seleccionó la concentración de cáscara inicial al 5% debido a que se obtuvo una concentración máxima de 157,54 mmol H₂/L y un porcentaje de degradación de 29.12±1.73% de la cáscara por parte de las bacterias.
- No se cumple el principio de similitud geométrica para el escalamiento. Las condiciones de operación seleccionadas para el escalamiento ensayo-error en el bioreactor con un volumen de trabajo de 2.5L fueron: una velocidad de agitación de 200 rpm, un pH inicial de 7, una temperatura de fermentación de 37°C y una concentración inicial del 5% de cáscara de banano por ser la condición seleccionada para efectuar la fermentación en el bioreactor según los resultados obtenidos a escala laboratorio.
- Al evaluar el proceso fermentativo en a una mayor escala, fue posible la producción de hidrogeno en el bioreactor con la concentración de 5% de cáscara. La máxima concentración obtenida fue de 668,4 mmol H₂/L luego de las primeras 32 horas y se obtuvo un porcentaje de degradación final de la cáscara del 94.97% por parte de las bacterias. Estos resultados son mejores a los obtenidos a escala laboratorio, por lo que se le atribuye al factor de agitación en la escala banco.
- A partir de la suplementación de medio RCM con cáscara de banano se lograron obtener etanol, ácido acético, ácido butírico e hidrógeno, por cual la cáscara es una alternativa económica para la fermentación acetobutílica.

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda investigar alternativas que favorezcan la degradación de la lignina de la cascara de banano con el fin del lograr liberar la totalidad, o en su mayoría, los azúcares fermentables que contiene el residuo.
- Se recomienda ampliar el campo de estudio, no solo para biohidrógeno sino también para la producción de bioetanol a partir de los resultados obtenidos en el presente proyecto.
- Se recomienda evaluar el proceso fermentativo con la variación de la especie de microorganismos para mejorar el proceso de degradación y producción de metabolitos de interés a partir de la cascara de banano.
- Se recomienda rediseñar un medio de cultivo apto, cuya fuente de carbono sean las cáscaras de banano con el fin de lograr su degradación sin el requerimiento de un agente energético externo.
- Se recomienda implementar en el bioreactor un sistema de control de pH, que permita mantener este parámetro en el rango óptimo para *Clostridium* con el fin de evitar la acidificación del medio y favorecer la producción de hidrógeno y metabolitos primarios que se produzcan durante el proceso biológico.
- Se recomienda instalar un sensor de hidrógeno en el bioreactor que permita llevar un mejor control en la producción de este biocombustible para ejecutar un proceso fermentativo.
- Se recomienda evaluar el proceso fermentativo en términos económicos para determinar la viabilidad del proceso a una escala mayor.
- Se recomienda evaluar el proceso fermentativo desde un volumen intermedio entre la escala laboratorio y los 2.5L evaluada en el presente trabajo con el fin de mejorar las condiciones del proceso y obtener mejores rendimientos en cuanto a la producción de biohidrógeno.
- Se recomienda que en el proceso de tamizado se emplee solo hasta la malla 35 MESH debido a que esta permite que el material pasante tenga el diámetro de partícula adecuado.
- Se recomienda realizar una recirculación del material de perdida por tamizado hasta el proceso de molienda con el fin mejorar el aprovechamiento del material.

BIBLIOGRAFÍA

ACEBO, D. y HERNANDEZ, A. Los métodos turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. En: Revista CENIC Ciencias Biológicas. Noviembre, 2012. p. 2-18.

AHMAD, Farah, *et al.* The prospect of microbial oil production and applications from oil palm biomass. En: Biochemical Engineering Journal. Diciembre, 2018. p. 1-52.

ALFONSO, Freddy, *et al.* Evaluación de la producción de hidrógeno usando la bacteria clostridium butyricum en un reactor tipo cstr a escala laboratorio. En: Revista de investigación Universidad de América. Enero-Junio, 2013. vol. 6. no. 1, p. 19-37.

ALLA, G.; AMER, A.; MALSH; G. y HUSSEIN, M.. Study on the use of banana peels for oil spill removal. En: Alexandria Engineering Journal. Mayo, 2017. p. 1-8.

ANAYA, Alejandro y PEDROZA, Humberto. Plantas piloto, el paso entre el huevo y la gallina. En: Tecnología, ciencia y educación. Enero-Julio 2008. vol. 23, no. 1, p. 31-39.

ANZOLA, Melida, *et al.* The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. En: Biotechnology Reports. Noviembre, 2014. vol. 5. p. 46-54.

ARANCETA, Javier y PEREZ, Carmen. Frutas, verduras y salud. Frutas – maduración de las frutas. Barcelona: Masson, 2006. p. 1-8. ISBN: 978-84-458-1669-1.

ARDILA, Kathy y VILORIA, Andrés. Evaluación del escalamiento de la producción de polihidroxialcanoatos (pha) por fermentación a partir de la bacteria mutante *Burkholderia cepacia* B27 a nivel semi-industrial. Trabajo de grado para optar título de ingeniería química. Bogotá D.C.: Fundación Universidad de América. 2017. p. 25.

ARGUN, H. y DAO, S. Bio-hydrogen production from waste peach pulp by dark fermentation: Effect of inoculum addition. En: International journal of hydrogen energy. Enero, 2017. vol. 42, no. 4. p. 2569-2574.

ARGUN, H. y KARGI, F. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: an overview. En: International journal of hydrogen energy. Julio, 2011. vol. 36, no. 13. p. 7443-7459.

ARREDONDO, Bertha y VOLTOLINA, Domenico. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. En: Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. México, 2007. p. 21-29.

Asociación de Bananeros de Colombia (Augura) 2017. Coyuntura bananera en Colombia. [Citado 16 de agosto de 2018]. Disponible en: <<http://www.augura.com.co/wp-content/uploads/2015/08/COYUNTURA-BANANERA-2017.pdf>>

AUORE, Guylene; PARFAIT, Berthe y FAHRASMANE, Louis. Bananas, raw materials for making processed food products. En: Trends in Food Science & Technology. 2009. vol. 20. p. 78-91.

ÁVILA, R. Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. En: Multiciencias. Marzo, 2012. vol. 12, p. 129-135.

BALLESTEROS, Víctor. Diseño de pozos profundos. Universidad Santo Tomás. Colombia. 2004 p.24.

BECKERS, L. *et al.* Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 and *Citrobacter Freundii* CWBI952 in pure and mixed cultures. En: *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 2010. p. 541-548.

BEDOYA, Andrea. *et al.* Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. En: Revista *DYNA*. Noviembre, 2008, vol 75. no.154, p. 137-157.

BERNAL, M., *et al.* Evaluating Colombian *Clostridium* spp. Strains hydrogen production using glycerol as substrate. En: *Electronic Journal of Biotechnology*. Marzo, 2015. p. 4.

BLANCO, Sergio. Producción de biohidrógeno a través de la fermentación oscura de residuos – Revisión crítica. Universidad Nacional de Colombia (2013) página 52.

BLASCO, Manuel. UF0013: Recolección, transporte, almacenamiento y acondicionamiento de la fruta. 5.1 ed. España. 29-30 p. ISBN: 978-84-16275-63-2.

BOTICARIO, Consuelo y CASCALES María. Digestión y metabolismo energético de los nutrientes. Plasencia: 2012. Página 60. ISBN 978-84-615-8137-5.

BRAVO, Nelson; MARMOLEJO, Fernando y SANCHEZ, Marina. Microbiología – Aspectos fundamentales. Cali: 2000. Página 88.

CANO, Natalia, *et al.* Biomasa lignocelulósica en Colombia, pretratamiento y productos de valor agregado. En: PIÑEROS, Y.; Aprovechamiento de biomasa

lignocelulósica, algunas experiencias de investigación en Colombia. Bogotá: Universidad Jorge Tadeo Lozano, 2014. 7-56 p.

CARTAYA, Nayra, *et al.* Evaluación de eficacia de productos naturales para el control de la pudrición de corona (crown rot) en plátano. Julio, 2011. p. 8.

CASE, Christine; FUNKE, Berdell y TORTORA, Gerard. Introducción a la microbiología. 9 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A., 2007. ISBN 978-950-06-0740-7.

CASSIR, Nadim; BENAMAR, Samia y LA SCOLA Bernard. Clostridium butyricum: from beneficial to a new emerging pathogen. En: Clinical microbiology and infection. Octubre, 2015. doi: 10.1016/j.cmi.2015.10.014. p. 3-8.

CASTILLO, Gabriela. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Instituto mexicano de tecnología del agua, coordinación de tecnología de comunicación, participación e información, subcoordinación de editorial y gráfica. 1 ed. México, 2004. p. 90-92.

CHAIPRAPAT, Sumate, *et al.* Effects of size and thermophilic pre-hydrolysis of banana peel during anaerobic digestion, and biomethanation potential of key tropical fruit wastes. En: Waste Management. 2017. p. 2-11.

CHANANCHIDA, Nathoa; UBONRAT, Sirisukpoca y NIPON, Pisutpaisala. Production of hydrogen and methane from banana peel by two phase anaerobic fermentation. En: Elsevier. Julio, 2014. vol. 50. p. 702–710.

CHEN, W-M., *et al.* P. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. En: Revista International Journal of Hydrogen Energy. 2005. vol 30, p 1063-1070.

CHEN, Ming; ZHAO, Jing y XIA Liming. Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. En: Journal of biomass and bioenergy. Mayo 2009. p. 1381 – 1385.

CLASSEN, P. *et al.* Utilization of biomass for the supply of energy carriers. En: Applied Microbiol Biotechnol. Agosto, 1999. p. 741-755.

COLOMBIA. CONGRESO DE LA REPÚBLICA. Ley 1715. (14, mayo, 2014). Por medio de la cual se regula la integración de las energías renovables no convencionales al sistema energético nacional. Bogotá, D.C., 2014.

CORRALES, Luisa, *et al.* Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. En: Revista NOVA. Noviembre, 2015. 58p.

CRESPO, Carlos. Mecánica de suelos y cimentaciones. 5 edición. México: Lisuma, 2004. p. 46-50.

CULTIMED. Manual básico de microbiología. Panreac Química S.A. P VI.(2003).

CUNHA, R, *et al.* Banana starch nanocomposite with cellulose nanofibers isolated from banana peel by enzymatic treatment: In vitro cytotoxicity assessment. En: Carbohydrate polymers. 2019. vol. 207. p. 169-179

DÍAZ, María; ESPITIA, Sandra; MOLINA, Francisco. Digestión anaerobia una aproximación a la tecnología. Bogotá D.C. Instituto de biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Primera edición. 2002. Página 41.

DORDONI, Roberta, *et al.* Effects of an acid/alkaline treatment on the release of antioxidants and cellulose from different agro-food wastes. En: Waste management. 2017. p. 1-10.

DORMOND, Herbert, *et al.* Evaluación preliminar de la cáscara de banano como material de ensilaje, en combinación con pasto King Grass (*Pennisetum purpureum*). En: Revista electrónica de las sedes regionales de la universidad de Costa Rica. Septiembre, 2011. 18 p. ISSN 2215-2458.

DÜRRE, P. (2008). Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. Annals of the New York Academy of Sciences, 1125, 353-62.

EL-DIN, Alaa, *et al.* Study on the use of banana peels for oil spill removal. En: Alexandria Engineering Journal. Mayo, 2017. p. 1-8.

ELIAS, Xavier. Biomasa y bioenergía: energía, agua, medioambiente, territorialidad y sostenibilidad. Madrid: Ediciones Diaz de Santos. 2012. p. 753. ISBN: 978-84-9969-125-1.

ESCALANTE, Humberto; ORDUZ, Janneth; ZAPATA, Henry; CARDONA, María; DUARTE, Marta. Atlas del potencial energético de la biomasa residual en Colombia. Unidad de planeación minero-energética (UPME 2008). p.118. ISBN: 978-958-8504-59-9.

ESCALANTE, Pilar *et al.* Optimización de la extracción enzimática de jugo de banano a partir de los cultivares enano gigante, FHIA-17 y FHIA-23. En: Revista Universidad y ciencia. Abril, 2013. vol.29, no.1, p. 1-9.

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE CULTIVOS TROPICALES – INTA Yuto – Jujuy [Citado 16 de agosto de 2018]. Disponible en:[https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-cultivo del banano.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-cultivo_del_banano.pdf)

EQUIVALENCIA INTERNACIONAL DE TAMICES. [Citado 12 de septiembre de 2018] Disponible en: <https://ucatedraivan.files.wordpress.com/2014/08/equivalencia-internacional-de-tamices.pdf>

FANG, Herbert; ZHU, Huguang; ZHANG, Tong. Phototrophic hydrogen production from glucose by pure and co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides*. En: International journal of hydrogen energy. Junio, 2006. vol. 31. p. 2223-2230.

FIERRO, Jose. El hidrogeno: Metodologías de producción En: Revista LYCHNOS. Septiembre, 2011. no.6, p. 51-54, ISSN 2171-6463.

FINAGRO. Fondo para el financiamiento el sector agropecuario-2018. [Citado 14 de agosto de 2018] Disponible en: <https://www.finagro.com.co/sites/default/files/node/basic-page/files/ficha_banano_version_ii.pdf>

GARCÍA, José. Clostridium. En: PUMAROLA, A., RODRÍGUEZ, A., GARCÍA, J. y PIÉDROLA, G.. Microbiología y parasitología médica. 2 ed. Madrid: Salvat, 2005. p. 387-401.

GAVIRIA, Juan Carlos. Evaluación del efecto del corte del pseudotallo en la planta madre, sobre los rendimientos del fruto y tiempo de floración en hijos de sucesión de la segunda generación en banano de variedad (*Cavendish valery*). Tesis de maestría. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, 2016. 1p.

GIRALDO, German, et al. Caracterización fisicoquímica del mango común (mangifera indica l.) durante su proceso de maduración. En: Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustria. Enero, 2013. vol. 11, no. 1, p. 10-18.

GIRALDO, Yesica y ORTIZ, María. Producción de biogas a partir de la codigestión de biomasa residual en un sistema de digestión anaerobia con agitación a escala laboratorio. Fundación Universidad de América (2018). Página 31.

GIROTTO, Francesca; ALIBARDI, Luca; COSSU, Raffaello. Food waste generation and industrial uses: A review. En: Waste Management. Junio, 2015.vol. 45. p. 32-41.

GOERING, M. y VAN SOESR, P. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications). Agricultural Handbook nº 379. Washington D.C. 1970. p. 9.

GÓMEZ, Alexander, *et al.* Transformación termoquímica de la biomasa residual del proceso de extracción del aceite de palma: tecnologías y perspectivas. En: Revista Palmas. 2004. vol. 25. p. 388-397.

GRANDA, Fabián. Obtención de azúcares fermentables por degradación fúngica de cáscara de banano (*Cavendish valery*). Trabajo de grado bioquímico farmacéutico. Loja: Universidad técnica particular de Loja, 2009. 49 p.

GUARNIZO, Anderson; MARTINEZ, Pedro y VALENCIA, Hoover. Pretratamientos de la celulosa y biomasa para la sacarificación. En: Scientia et Technica Año XV. Agosto, 2009. no. 42, p. 284-289. ISSN 0122-1701.

GUERVOS, María. El hidrógeno como alternativa energética del futuro. [Citado 9 de agosto de 2018] Disponible en: <<http://estherguervos.galeon.com/2ha.pdf>>

HERNÁNDEZ, Alicia. El mantenimiento de los microorganismos. En: Microbiología industrial. Editorial estatal a distancia. p. 22.

HONGZHEN, Luo, *et al.* "Recent advances and strategies in process and strain engineering for the production of butyric acid by microbial fermentation." *Bioresource technology* 253 (2018): 343-54. Web.

HO, Kuo-Ling; CHEN, Yu-You y LEE, Duu-Jong. Biohydrogen production from cellobiose in phenol and cresol-containing medium using *Clostridium* sp. R1. En: International Journal of Hydrogen energy. Julio, 2010. p. 10239-10244

HOUSAGUL, Saowaluck. Biomethane production from co-digestion of banana peel and waste glycerol. En: Energy Procedia. 2014. vol. 61. p. 2219 – 2223.

I. Ntaikou, G. Antonopoulou, and G. Lyberatos. "Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review." *Waste and Biomass Valorization* 1.1 (2010): 21-39. Web.

INGRAHAM, John *et al.* Microbiología. Crecimiento microbiano. Traducido por Mario Gacto. 2 ed. España. Editorial Reverté. 2005. ISBN: 84-291-1868-3.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. Compendio de normas para trabajos escritos. NTC-1486-6166. Bogotá D.C.: El instituto, 2018. 153p.

INSTITUTO TECNOLOGICO DE CANARIAS S.A.. Energías renovables y eficiencia energética. 1 ed. Canarias: 2008. Página 16. ISBN: 978-84-69093-86-3.

JÁCOME, J. Validación del Método Gravimétrico para la Determinación de Grasa en el Laboratorio Ecuachemlab Cía. Ltda. Trabajo de grado Ingeniería bioquímica. Ambato: Universidad técnica de Ambato. Abril, 2016. 59 p.

JARAMILLO, Gladys y ZAPATA, Liliana. Aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos en Colombia. Antioquia: Universidad de Antioquia, facultad de ingeniería. 2008. p. 19.

JAUREGUI, Manuel y MAHECHA, Erika. Evaluación de un biorreactor escala laboratorio para la producción de hidrógeno a partir de *Clostridium spp* utilizando glicerol como fuente de carbono. Fundación Universidad de América. (2015).

JULON, Withman; MEJÍA, Jorge. Género Clostridium. [Citado 22 de agosto de 2018] Disponible en: <<https://es.scribd.com/doc/66189334/Clostridium>>

KANCHANASUTA, Suwimon; et al. Stability of Clostridium butyricum in biohydrogen production from non-sterile food waste. En: International journal of hydrogen energy. Febrero, 2017. vol. 42. no. 5. p. 3454-3465.

KIM, Mi-Sun, *et al.* Fermentative hydrogen production from anaerobic bacteria using a membrane bioreactor. En: World hydrogen energy conference (16: 13-16, Junio: Lyon, Francia). Scopus. Lyon, 2006. p. 1-9.

KJELDAHL, J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. En: Zeitschrift für Analytische Chemie. 1883. p 366-382.

KURHADER, A. et. Al. Effect of banana peel powder on bioactive constituents and microstructural quality of chapatti: unleavened Indian flat bread. En: Journal of food measurement and characterization. Agosto, 2015. p. 1-10.

Laboratorios Dr. Calderón Laboratorios Ltda. Análisis bromatológico Van Soest Dr Calderón Lbs. [Citado 8 de junio de 2019] Disponible en: <<file:///C:/Users/maria/Downloads/ANALISIS%20BROMATOLOGICO%20VAN%20SOEST%20-%202016.pdf>>

LAXMAN, Vinayak, et al. Surfactant mediated enhanced glycerol uptake and hydrogen production from biodiesel waste using co-culture of Enterobacter aerogenes and Clostridium butyricum. En: Renewable Energy. Marzo, 2016. vol. 95. p. 542-551.

LONDOÑO, S. y RODRÍGUEZ, T. Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura: una revisión crítica (1993-2011). En: Ingeniare. Revista chilena de ingeniería. 2012. vol. 20, no. 3. p. 398-411.

LUONG N., *et al.* Application of rumen and anaerobic sludge microbes for bio harvesting from lignocellulosic biomass. En:Chemosphere. Abril, 2019. 703 p.

MACCABE, Warren; SMITH, Julián y HARRIOTT, Peter. Operaciones unitarias en ingeniería química. 4 ed. España: McGraw-Hill, 1991. p. 867-987

MALAGÓN, D.; LADINO, A. y JÁUREGUI, M. The effect of the initial concentration of glycerol on the hydrogen produced by strains of the genus *Clostridium* spp. En: International journal of sustainable engineering. Octubre, 2017. vol. 10. p. 2-6.

MALAGÓN ROMERO, Dionisio, *et al.* Characterization of a polymeric membrane for the separation of hydrogen in a mixture with CO₂. En: The open fuels & energy science journal (2016). vol 9. p.126-136.

MATHEWS, J. & WANG, G. (2009). Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy, 34,7404-7416.

MAZZEO, Miguel, *et al.* Aprovechamiento industrial de residuos de cosecha y poscosecha del plátano en el departamento de caldas. En: Revista en educación en ingeniería N° 9. Junio, 2010. 129 p. ISSN 1900-8260.

MEDINA, Yuliana. Evaluación de la concentración de *clostridium acetobutylicum* ATCC 824 para la producción de butanol a partir de glucosa. Trabajo de grado microbiólogo industrial. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencia. 2013. p. 13-14.

MESSET, J. *et al.* Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium* spp.. En: Biotechnol Biofuels. Mayo, 2012. p. 1-15.

MERCK. Ficha de datos de seguridad. [Citado 19 de marzo de 2019] Disponible en:<http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-RU-Site/ru_RU/-/USD/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-105411&DocumentId=201602.356.ProNet&DocumentUID=28219503&DocumentType=DS&Language=EN&Country=NF&Origin=PDP>

MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. En: Analytical Chemistry. Marzo, 1959. p. 426-428.

MINISTERIO DE ENERGÍA. Manual del biogás. Proyecto CHI/00/G32, Chile: Remoción de barreras para la electrificación rural con energías renovables. 2011. p.8.

MOHAPATRA, Debandy; MISHRA, Savyasachi y SUTAR, Namrata. Banana and its by-product utilisation: an overview. En: Journal of scientific & industrial research. Mayo, 2010. vol. 69 p. 323-329.

MONSALVE, John.; MEDINA, Victoria. y RUIZ, Adriana. Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca. Grupo de bioprocesos y combustibles alternativos. Universidad Nacional de Colombia. Mayo (2006) p 23-27.

MONTAÑO, Héctor. Producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico de moringa oleífera. Tesis de maestría en Ingeniería mecánica. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingeniería. 2014. p. 25.

MONTOYA, Dolly. Anaerobic, solvent-producing bacteria: Molecular characterisation, polysaccharolytic activity and agroindustrial waste degradation. Tesis de doctorado. Alemania: Universidad de Múnich; 2003. p. 41.

MORAIS DE CARVALHO, D.; DE QUIROZ, J. y COLODETTE, J. Assessment of alkaline pretreatment for the production of bioethanol from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. En: Journal of Industrial Crops and products. Septiembre, 2016. p. 932-941.

MORALES, Silvia. Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos. Tesis doctoral en ciencias químicas. Madrid: Universidad autónoma de Madrid. Facultad de ciencias. 2015. p. 34.

MOSET, V., *et al.* Combined low thermal alkali addition and mechanical pretreatment to improve biogas yield from wheat straw. En: Journal of Cleaner Production. Octubre, 2017. p. 1-28.

MUÑOZ, Eduardo. escalamiento del proceso de obtención de fructooligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con células permeabilizadas de *Candida apícola*. Tesis para obtener grado de académico. Jalisco: centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco. 2016. 26 p.

MUTHUKUMAR, Karuppan y VELMURUGAN, Rajendran. Ultrasound-assisted alkaline pretreatment of sugarcane bagasse for fermentable sugar production: Optimization through response surface methodology. En: Bioresource Technology. Febrero, 2012. vol.112. p. 293-299.

NIÑO, Lilibeth; ACOSTA, Alejandro y GELVES, Ricardo. Evaluation de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática e residuos lignocelulósicos de uca (*Manihot esculenta Crantz*). En: Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquía. Diciembre, 2013. p. 317-326.

NOGUÉS, Fernando; GARCÍA, Daniel y REZEAU, Adeline. Energías renovables, Energía de la biomasa. Zaragoza: Prensas universitarias de Zaragoza, 2010. p.16. ISBN: 978-84-92774-91-3.

ODEDINA, Mary, et al. Effects of size and thermophilic pre-hydrolysis of banana peel during anaerobic digestion, and biomethane potencial of key tropical fruit waste. En: Waste management. Julio, 2017. vol. 68. p.128-138.

ORDOÑEZ, Arturo Gabriel. Diseño de un proceso para la maduración acelerada de banano utilizando etefón como agente madurador. Tesis de pregrado. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2005. 13p.

ORCHARD, J. y DABZIE, B.. Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de banano s y plátanos: criterios y métodos. Pensilvania:1997. 16p.

ORGAZ, Arturo. Energía renovable: la biomasa. Empresa provincial de energía en córdoba (EPEC). 0351- 429 6736. p.2.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. Situación del mercado del Banano 2015-2016. [Citado 27 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i7410s.pdf>

PATHAK, Pranav y MANDAVGANE, Sachin. Preparation and characterization of raw nd carbón from banana peel by microwave activation: Application in citric acid adsorption. En: Journal of enviromental chemical engineering. Septiembre, 2015. vol. 3. p. 2435-2447.

PEÑA, A., MOLINA, D. y TORRES, R. Hidrólisis de almidón de yuca mediante la utilización de preparaciones solubles e insolubilizadas de alfa-amilasa (*Aspergillus niger*). En: Memorias del IV Simposio de Química Aplicada - SIQUIA. Septiembre, 2009.

PÉREZ, Francisco. Escalado de una torre de absorción. Trabajo de grado ingeniería química. Sevilla: Universidad de Sevilla. Escuela técnica superior de ingeniería. 2016. p. 4-5. N, Eika. Pretreatment and saccharification of lignocellulosic biomass. En: TOJO, Seishu. research approaches to sustainable biomass systems, 2014. p. 181-204.

ROMERO, Arturo. Aprovechamiento de la biomasa como fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles. En: Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Física, Naturales. 2010. vol 104. p. 331-345.

ROMERO, Hugo, AYALA, Humberto, LAPO, Byron. Efecto de tres-tratamientos de cáscara de banano para la obtención de jarabe glucosado mediante hidrólisis enzimática. En: Revista Avances en Química. Abril, 2015. vol.10, no.1. p.79-82.

RUIZ, Ángela. Factores de escala para la producción biotecnológica de etanol carburante. Tesis para título de doctorado en ingeniería. Medellín: Universidad nacional de Colombia. 2009. 21 p

SÁNCHEZ, A., *et al.* Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. En: Revista Tumbaga. 2010. no. 5. p. 61-91.

SÁNCHEZ, Jesús. Optimización de la agitación de un digestor anaerobio mediante mecánica de fluidos computacional. España, Madrid. Universidad Politécnica de Madrid. 2016. Página 13.

SEPPALA, Jenni; *et al.* Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* and *Escherichia coli* in pure and cocultures. En: International journal of hydrogen energy. Julio, 2011. vol. 36. p. 10701-107008.

SERKAN, Eker y BURCU Erkul. Biohydrogen production by extracted fermentation from sugar beet. En: Elsevier. Diciembre, 2017, p. 1-10.

SHARMA, N.; KALRA, K.; SINGH, H. and BANSAL S. Optimization of fermentation parameters for production of ethanol from kinnow waste and banana peels by simultaneous saccharification and fermentation. En: Indian Journal of Microbiology. Diciembre, 2007. no. 47. p. 310-316.

SILVA, Viviane. Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos para la producción de biocombustibles y bioproductos. Tesis doctoral. Valladolid: Universidad de Valladolid. Escuela técnica superior de ingenierías agrarias. Septiembre, 2015. p. 2.

SINHA, P. y PANDEY, A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. En: International journal of hydrogen energy. Julio, 2011. vol. 36, no. 13. p. 7460-7478.

TAHERZADEH, Mohammad y KAREMI, Keikhorso. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. En: International Journal of Molecular Sciences. Septiembre, 2008. p. 1621-1651.

UNIVERSIAD TECNOLÓGICA NACIONAL. Tinción y observación de microorganismos. [Citado 19 de marzo de 2019] Disponible en: <https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf>

VAN GINKEL, Steven y SUNG, Shihwu. Biohydrogen Production as a Function of pH and Substrate Concentration. En: Environmental Science & Technology. Noviembre, 2001. vol.35, no. 24, p. 4726-4730.

WANG, Ming, *et al.* An alternative parameter to characterize biogas materials: Available carbon-nitrogen ratio. En: Waste Management. Febrero, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2017.02.025>.

WIEDMANN, Martin; ZHANG, Wei. Genomics of foodborne bacterial pathogens. 2011. p. 96. ISBN: 978-1-4419-7685-7.

YAZDANKHAN, S.; *et al.* Use of magnetic beads for Gram staining of bacteria in aqueous suspension. En: Journal of Microbiological Methods. September 2001. p. 369-371.

YIN, Yanan y WANG, Jianlong. Isolation and characterization of a novel strain *Clostridium butyricum* INET1 for fermentative hydrogen production. *En:* International journal of hydrogen energy. Marzo, 2017. vol. 42. p. 12173-12180.

YUNG-CHUNG, L., *et al.*, Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. *International Journal of Hydrogen*. 2017. p. 15815-15822.

YUSUFU, P.A.; MOSIKO, T.B. y OJUKO, O.O.. Effect of firm ripe plantain fruit flour addition on the chemical, sensory and microbial quality of fura powder. *En:* Official journal of Nigerian institute of food science and technology N° 1. Mayo, 2015. vol. 32, 38-44 p.

ZHANG, H., BRUNS, M. y LOGAN, B.. Biological Hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. En: Water Research. Enero, 2009. p. 728-734.

ANEXOS

ANEXO A.
DE RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA CURVA DE HUMEDAD PARA
DOS MUESTRAS DE CASCARA DE BANANO MADURA

No. toma del peso	Muestra	Peso (g)	Tiempo (min)	No. toma del peso	Muestra	Peso (g)	Tiempo (min)
1	A	59,4	0	1	B	58,3	0
2	A	57,1	20	2	B	56,3	20
3	A	54,6	40	3	B	54,2	40
4	A	48,3	60	4	B	47	60
5	A	43,7	80	5	B	41,8	80
6	A	40,5	100	6	B	38,7	100
7	A	34,7	120	7	B	35,2	120
8	A	31,8	140	8	B	30,8	140
9	A	28,5	160	9	B	27	160
10	A	24,3	180	10	B	22,3	180
11	A	20	200	11	B	17,8	200
12	A	14,9	220	12	B	13,4	220
13	A	11,6	240	13	B	10,3	240
14	A	9	260	14	B	8,1	260
15	A	8,9	280	15	B	6,6	280
16	A	7,3	300	16	B	5,6	300
17	A	7	320	17	B	5,47	320
18	A	6,8	340	18	B	5,42	340
19	A	6,53	360	19	B	5,41	360
20	A	6,5	380	20	B	5	380
21	A	6,5	400	21	B	5	400

Fuente: elaboración propia.

**Anexo B.
ANALISIS DE TAMIZADO.**

No. malla	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% Retenido acumulado	% Pasante acumulado
5	3,965	0,7	0,03494758	0,03494758	99,9650524
10	1,982	52,3	2,61108337	2,64603095	97,353969
35	0,496	390	19,4707938	22,1168248	77,8831752
60	0,248	520	25,9610584	48,0778832	51,9221168
120	0,124	630	31,4528208	79,5307039	20,4692961
230	0,062	405	20,2196705	99,7503744	0,24962556
Fondos	0	5	0,24962556	100	0
TOTAL	-	2003	100		

Fuente: elaboración propia.

**Anexo C.
ANÁLISIS PROXIMAL DE RESULTADOS EN BASE SECA DE LA
CÁSCARA DE BANANO PRETRATADA.**



ASISTENCIA TÉCNICA AGRÍCOLA
CONTROL DE CALIDAD
FOLIAR
SUELOS
AGUAS

ANÁLISIS BROMATOLÓGICO - VAN SOEST

Propietario: Alejandra Lara Triana	Fecha de Análisis: 01-abr-19	No. Laboratorio: 4922
Dirección: Diag 7 A Bis C No. 73 B - 42	Fecha de Muestreo: 03-feb-19	Fecha de Recepción: 21-mar-19
Ciudad: Bogotá	Orden de T. # 63886	
Producto/Material: Residuos Orgánicos Sólidos	Identificación de la Muestra: Cascara de Banano	Características: Producto color café
Municipio: BOGOTÁ CUN	Otros Datos	

RESULTADOS DEL ANÁLISIS EN BASE SECA

ANÁLISIS PROXIMAL		Proteína:	7.50 %	Celulosa:	8.64 %
		Lignina:	9.76 %	Hemicelulosa:	14.16 %
		Carbohidratos Total: 40.36 %			
Humedad de Laboratorio:	10.09 %	C	39.37 %	H	5.67 %
Grasas (Lípidos):	5.24 %	O	39.37 %	N	1.2 %
Almidón:	38.34 %	S	0.11 %		
Fibra Cruda:	8.98 %				
Rel C/N:	32.81				

Prohibida la copia total o parcial del presente informe. Toda copia autorizada deberá llevar este sello en original y en cada una de sus páginas. Los presentes resultados analíticos corresponden exclusivamente a la muestra recibida en el Laboratorio y no a otros materiales de la misma procedencia.



Carol Ortiz Rodríguez
Jefe Control de Calidad; T.P. 20884

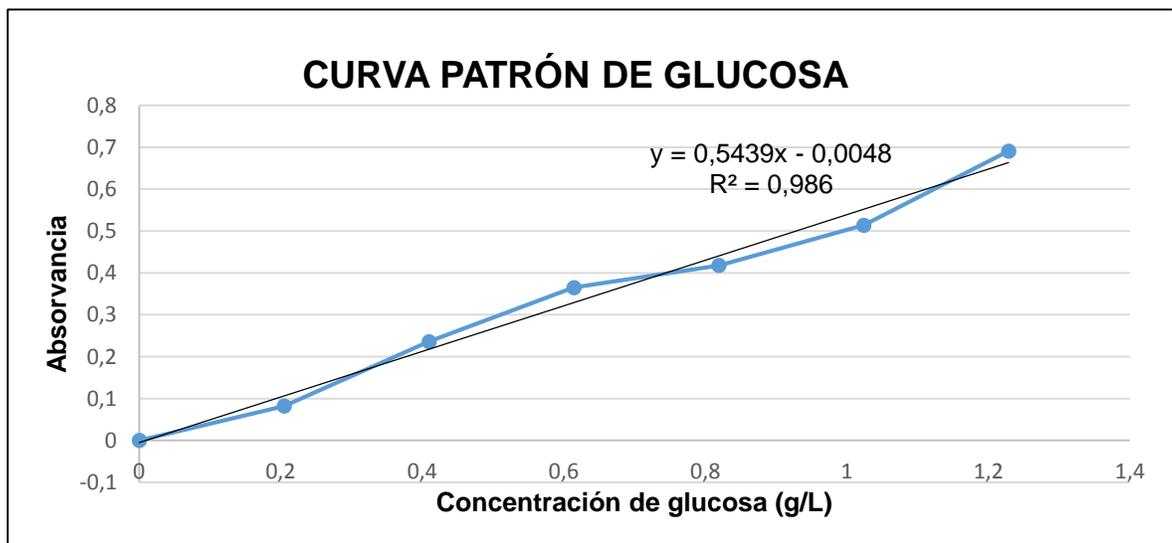
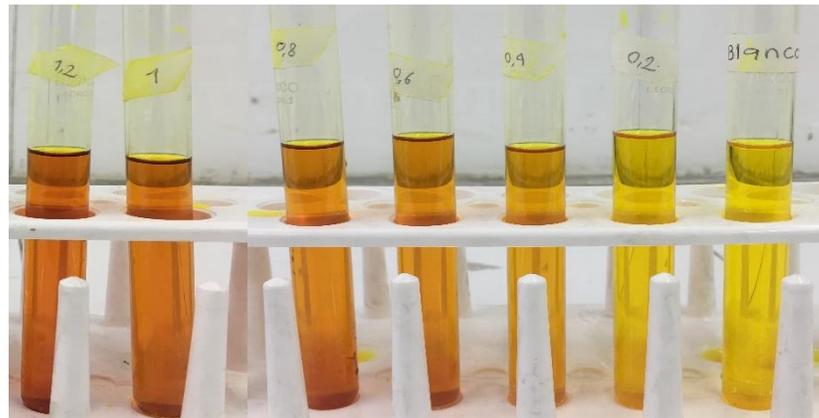
Felipe Calderón Sáenz
Director General; T.P. 3186

LABORATORIO Y OFICINAS: AV. CRA. 20 No. 87-81 - TELS.: 622 2687, 622 5567, 622 4985, 533 1559, 623 6576 ☎ 320 493 6197
E-MAIL: calderon@drcalderonlabs.com - WEB SITE: www.drcalderonlabs.com - BOGOTÁ, D.C. - COLOMBIA.

Anexo D.
CURVA DE PATRÓN PARA EL MÉTODO DE DNS Y
ESPECTROFOTOMETRÍA Y DILUCIONES DE LA EXTRACCIÓN.

No. tubo	Volumen madre (ml)	Volumen agua (ml)	Volumen total (ml)	Concentración (g/l)	Absorbancia
Blanco	0	10	10	0	0
1	1	9	10	0,2048	0,082
2	2	8	10	0,4096	0,236
3	3	7	10	0,6144	0,365
4	4	6	10	0,8192	0,418
5	5	5	10	1,024	0,514
6	6	4	10	1,2288	0,691

Fuente: elaboración propia.



Fuente: elaboración propia.

Muestra duplicado	ABS	[α] Azúcares (g/L)	Muestra	ABS	[α] Azúcares (g/L)	Promedio	Desviación estandar
1% T=40 t=0	0,79 2	1,465	1% T=40 t=0	0,75 6	1,399	1,432	0,047
1% T=40 t=30	0,76 4	1,413	1% T=40 t=30	0,74 5	1,379	1,396	0,025
1% T=40 t=60	0,70 8	1,311	1% T=40 t=60	0,71 3	1,320	1,315	0,007
1% T=40 t=90	0,73 1	1,353	1% T=40 t=90	0,69 0	1,277	1,315	0,053
1% T=70 t=0	0,42 8	0,796	1% T=70 t=0	0,37 6	0,700	0,748	0,068
1% T=70 t=30	0,28 1	0,525	1% T=70 t=30	0,35 2	0,656	0,591	0,092
1% T=70 t=60	0,32 4	0,605	1% T=70 t=60	0,22 1	0,415	0,510	0,134
1% T=70 t=90	0,31 7	0,592	1% T=70 t=90	0,27 1	0,507	0,549	0,060
2% T=40 t=0	0,89 4	1,653	2% T=40 t=0	0,89 7	1,658	1,655	0,004
2% T=40 t=30	0,78 6	1,454	2% T=40 t=30	0,80 3	1,485	1,470	0,022
2% T=40 t=60	0,56 1	1,040	2% T=40 t=60	0,57 1	1,059	1,049	0,013
2% T=40 t=90	0,46 9	0,871	2% T=40 t=90	0,54 2	1,005	0,938	0,095
2% T=70 t=0	0,89 7	1,658	2% T=70 t=0	0,99 3	1,835	1,746	0,125
2% T=70 t=30	0,38 4	0,715	2% T=70 t=30	0,45 5	0,845	0,780	0,092
2% T=70 t=60	0,23 1	0,434	2% T=70 t=60	0,18 5	0,349	0,391	0,060
2% T=70 t=90	0,12 7	0,242	2% T=70 t=90	0,15 2	0,288	0,265	0,033
H ₂ O T=40 t=0	0,41 0	0,763	H ₂ O T=40 t=0	0,38 9	0,724	0,743	0,027
H ₂ O T=40 t=30	0,36 7	0,684	H ₂ O T=40 t=30	0,32 5	0,606	0,645	0,055
H ₂ O T=40 t=60	0,35 0	0,652	H ₂ O T=40 t=60	0,37 6	0,700	0,676	0,034
H ₂ O T=40 t=90	0,23 1	0,434	H ₂ O T=40 t=90	0,37 1	0,691	0,562	0,182

H ₂ O T=70 t=0	0,61 7	1,143	H ₂ O T=70 t=0	0,60 7	1,125	1,134	0,013
H ₂ O T=70 t=30	0,61 6	1,141	H ₂ O T=70 t=30	0,66 0	1,222	1,182	0,057
H ₂ O T=70 t=60	0,60 8	1,127	H ₂ O T=70 t=60	0,71 5	1,323	1,225	0,139
H ₂ O T=70 t=90	0,62 9	1,165	H ₂ O T=70 t=90	0,65 5	1,213	1,189	0,034
HCl T=40 t=0	0,60 1	1,114	HCl T=40 t=0	0,63 1	1,169	1,141	0,039
HCl T=40 t=30	0,63 6	1,178	HCl T=40 t=30	0,69 3	1,283	1,231	0,074
HCl T=40 t=60	0,65 6	1,215	HCl T=40 t=60	0,66 0	1,222	1,219	0,005
HCl T=40 t=90	0,61 0	1,130	HCl T=40 t=90	0,58 7	1,088	1,109	0,030
H ₂ O+HCl T=40 t=0	0,95 8	1,770	H ₂ O+HC I T=40 t=0	0,92 5	1,710	1,740	0,043
H ₂ O+HCl T=40 t=30	0,48 4	0,899	H ₂ O+HC I T=40 t=30	0,48 2	0,895	0,897	0,003
H ₂ O+HCl T=40 t=60	0,93 8	1,733	H ₂ O+HC I T=40 t=60	0,46 6	0,866	1,732	0,002
H ₂ O+HCl T=40 t=90	0,46 5	0,864	H ₂ O+HC I T=40 t=90	0,46 8	0,869	0,867	0,004

DILUCIONES				
MUESTRA	C1	V1	C2	V2
1% T=40 t=0	1,4319	10	4,7729	3
1% T=40 t=30	1,3960	10	4,6534	3
1% T=40 t=60	1,3151	10	4,3838	3
1% T=40 t=90	1,3151	10	4,3838	3
1% T=70 t=0	0,7479	10	1,4959	5
2% T=40 t=0	1,6553	10	3,3105	5
2% T=40 t=30	1,4696	10	2,9391	5

2% T=40 t=60	1,0495	10	2,0989	5
2% T=40 t=90	0,9382	10	1,8764	5
H2O T=40 t=0	0,7433	10	3,7167	2
H2O T=40 t=30	0,6450	10	3,2249	2
H2O T=40 t=60	0,6762	10	3,3811	2
H2O T=40 t=90	0,5622	10	2,8112	2
H2O T=70 t=0	1,1340	10	5,6702	2
H2O T=70 t=30	1,1818	10	5,9092	2
H2O T=70 t=60	1,2250	10	6,1252	2
H2O T=70 t=90	1,1892	10	5,9459	2
HCl T=40 t=0	1,1414	10	5,7069	2
HCl T=40 t=30	1,2306	10	6,1528	2
HCl T=40 t=60	1,2186	10	6,0930	2
HCl T=40 t=90	1,1092	10	5,5461	2
H2O+HCl T=40 t=30	0,8969	10	1,7937	5
H2O+HCl T=40 t=90	0,8665	10	1,7330	5
H2O+HCl T=40 t=60	0,8656	10	1,7312	5

Fuente: elaboración propia.

Donde:

ABS: Absorbancia.

C₁: Concentración inicial (g/L).

C₂: Concentración final después de diluir (g/L).

V₁: Volumen inicial (ml).

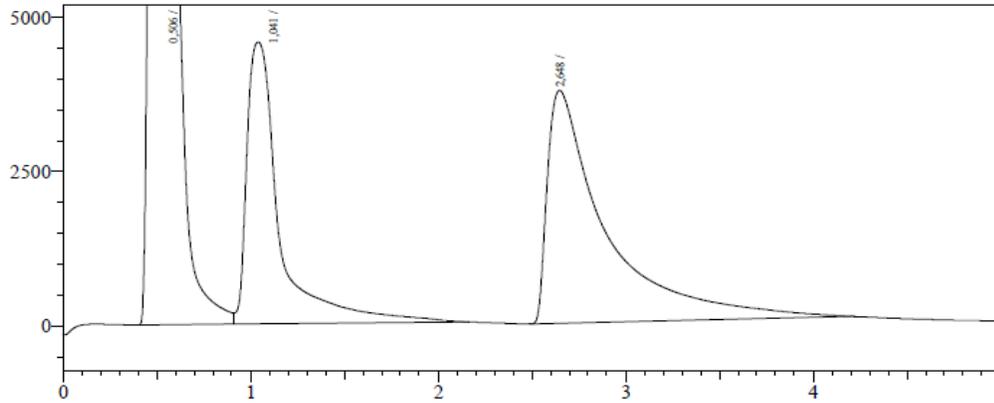
V₂: Volumen final (mm).

T: Temperatura (°C).

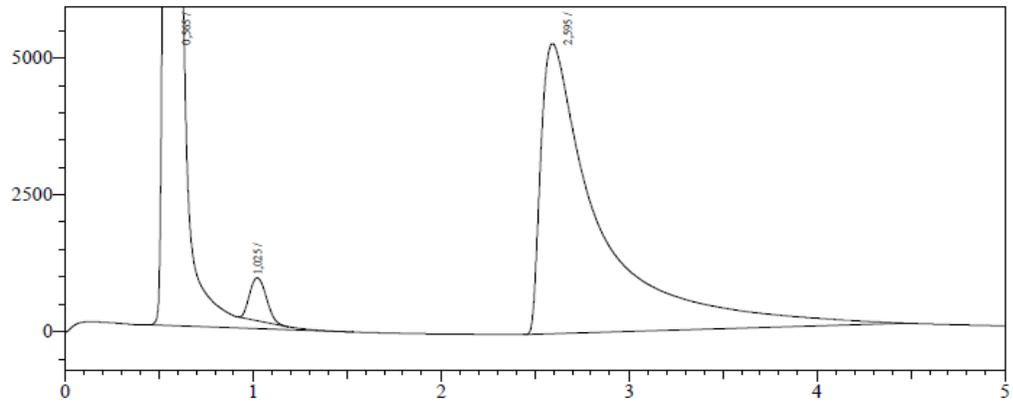
t: Tiempo (minutos).

Anexo E. CROMATOGRAFIA DE GAS A ESCALA LABORATORIO.

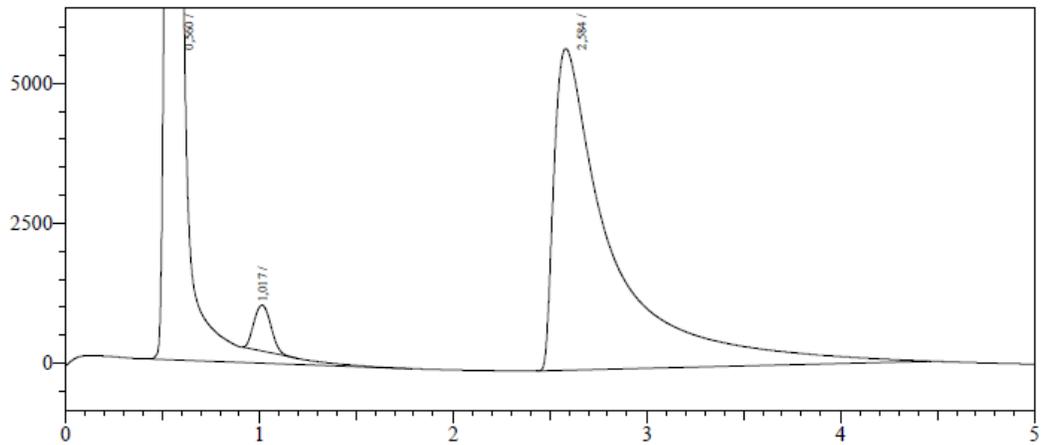
- 0% de cáscara de banano.



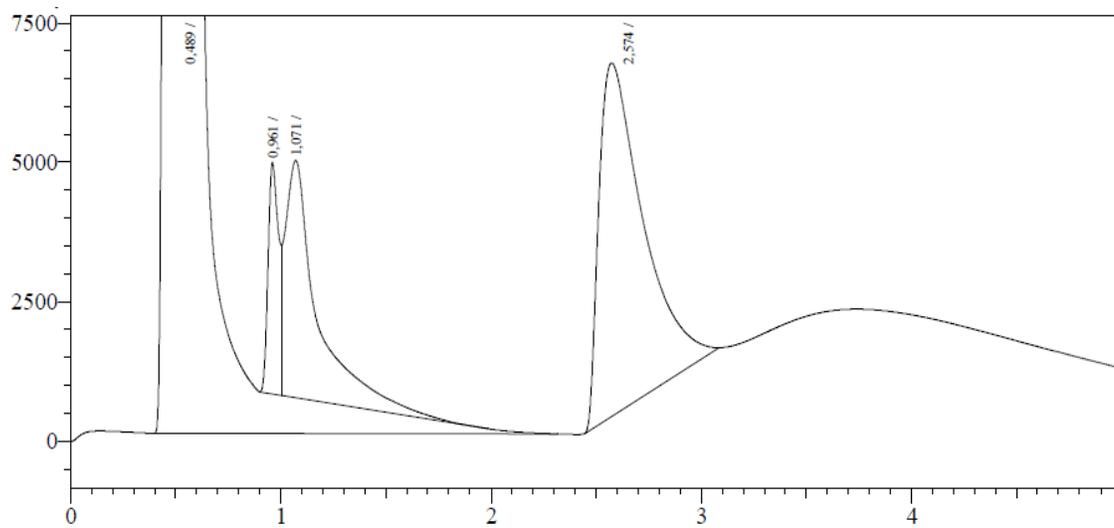
- 2.5% de cáscara de banano.



- 5% de cáscara de banano.



Anexo F.
CROMATOGRAFIA DE GAS A ESCALA BANCO.



Anexo G.
SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA LA HIDRÓLISIS ALCALINA.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0,93988885
Coeficiente de determinación R ²	0,883391051
R ² ajustado	0,650173152
Error típico	1,11163204

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadística t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción (a)	8,854012175	2,691231349	3,289948364	0,187855237	-25,34132434	43,04934869	-25,34132434	43,04934869
Variable X 1 (b1)	-0,090759126	0,037054401	-2,449348072	0,246764599	-0,561579936	0,380061683	-0,561579936	0,380061683
Variable X 2 (b2)	-139,569161	111,163204	-1,255533809	0,428182325	-1552,03159	1272,893268	-1552,03159	1272,893268

Ecuación lineal (ANOVA 2²):

$$y = f(X_1, X_2) \rightarrow y = a + (b_1 \cdot X_1) + (b_2 \cdot X_2)$$

$$y = 8.854 - 0.09075 \cdot X_1 - 139,569 \cdot X_2$$

Para la gráfica:

		X1						
		40	45	50	55	60	65	70
X2	1%	3,827955507	3,374159874	2,920364242	2,466568609	2,012772977	1,558977345	1,105181712
	1,2%	3,548817185	3,095021552	2,64122592	2,187430287	1,733634655	1,279839023	0,82604339
	1,4%	3,269678863	2,81588323	2,362087598	1,908291965	1,454496333	1,000700701	0,546905068
	1,6%	2,990540541	2,536744908	2,082949276	1,629153643	1,175358011	0,721562379	0,267766746
	1,8%	2,711402219	2,257606586	1,803810954	1,350015321	0,896219689	0,442424057	-0,011371576
	2%	2,432263897	1,978468264	1,524672632	1,070876999	0,617081367	0,163285735	-0,290509898

Dónde: X₁= Factor temperatura y X₂= Factor concentración de NaOH