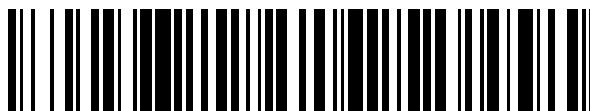


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 184**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 3/00 (2006.01)

C12P 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2015** **PCT/FR2015/052256**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016** **WO16030623**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2015** **E 15760224 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019** **EP 3186359**

54 Título: **Procedimiento de producción de hidrógeno por fermentación oscura a partir de biomásas obtenidas de la industria vitivinícola, sin aporte de consorcio microbiano**

30 Prioridad:

25.08.2014 EP 14306312
15.10.2014 FR 1459895

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2020

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (25.0%)
4, rue Blaise Pascal
67000 Strasbourg, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.0%);
INSTITUT NATIONAL SUPERIEUR DES
SCIENCES AGRONOMIQUES DE
L'ALIMENTATION ET DE L'ENVIRONNEMENT
(25.0%) y
UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE (25.0%)

72 Inventor/es:

ERNST, BARBARA;
GOUGEON, RÉGIS;
FRANÇOIS-LOPEZ, ÉMILIE;
DUMAS, CHRISTINE;
VUILLEUMIER, STÉPHANE y
ALEXANDRE, HERVÉ

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 742 184 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de hidrógeno por fermentación oscura a partir de biomásas obtenidas de la industria vitivinícola, sin aporte de consorcio microbiano

Campo técnico

La presente invención se refiere a la producción de hidrógeno por fermentación oscura a partir de biomásas obtenidas de la industria vitivinícola (fangos, orujos, tortas de filtrado, depósitos, orujos agotados, aguas de lavado de materiales de recolección, selección y vinificación).

La presente invención encuentra sobre todo una aplicación en el sector de la energía con la producción de un vector energético (hidrógeno) a partir de una biomasa agrícola. Otra aplicación posible es la producción de hidrógeno para uso industrial usando el hidrógeno como reactivo in situ y preparando biomásas metabolizables.

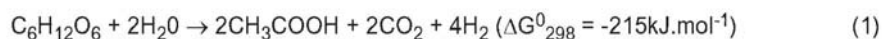
En la descripción mostrada a continuación, las referencias entre corchetes ([]) remiten a la lista de referencias presentadas al final del texto.

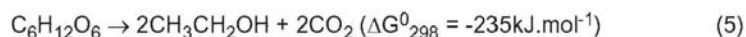
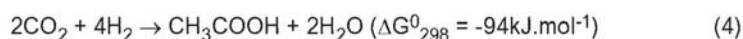
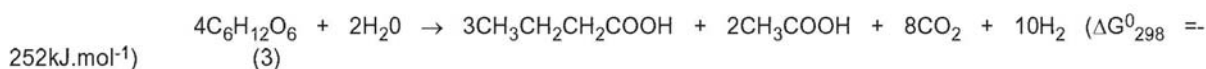
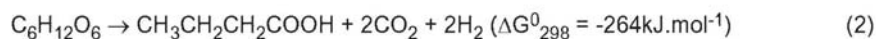
Estado de la técnica

Francia es el mayor productor de vino: 50 millones de hectolitros producidos en promedio al año entre 2000 y 2011 [1]. La generación de residuos orgánicos, incluidos subproductos como los orujos de uva, los fangos, los depósitos, los raspones y lodos deshidratados, se considera uno de los problemas más importantes a los que debe hacer frente la industria mundial del vino [2]. Los orujos de uva representan el 27 % del rendimiento medio de la viña que se sitúa en torno a 7.000 kg.ha⁻¹ en Francia, y están compuestos en el 4,5 % por pepitas de uva, en el 19,5 % por piel de uva y en el 3 % por raspones [3, 4]. Según el Reglamento del Consejo Europeo 1234/2007, los orujos de uva y los depósitos de vino deben ser enviados a las destilerías de alcohol salvo las pequeñas industrias vinícolas. Cada año se envían a las destilerías francesas aproximadamente 850.000 toneladas de orujo de uva [5]. Teniendo en cuenta las elevadas cantidades producidas cada año por la industria del vino, el desfase creciente entre problemas ambientales y escasez de combustibles fósiles, la valoración de los subproductos y los residuos es inevitable. Las valoraciones actuales se refieren a: polifenoles, taninos como colas para madera, ácido tartárico, sustratos vegetales, alimentación animal, bioetanol, etc.

Hoy en día, el 95 % del hidrógeno es producido a partir de combustibles fósiles mediante procedimientos térmicos (por ejemplo, reformado por vapor del gas natural). Entre las posibilidades de valoración y en el marco de la exploración de nuevas fuentes de energía renovable, el hidrógeno (H₂) producido a partir de biomásas es un vector de energía propio y prometedor. En efecto, el hidrógeno puede usarse como vector energético en las pilas de combustible. Las tecnologías de producción de hidrógeno a partir de la biomasa pueden clasificarse en dos categorías: (i) los procesos termoquímicos: gasificación (procedimiento directo de producción de H₂), pirólisis, licuefacción hidrotérmica, y (ii) los procesos bioquímicos: fotólisis directa/indirecta, fermentación [6], esterificación, digestión. Estos últimos, aunque poco consumidores de energía con respecto a los procesos termoquímicos, producen respectivamente etanol, biodiésel y biogás que deberán someterse a un tratamiento de reformado, etapa térmica catalítica, para producir hidrógeno. Entre estos procedimientos, la fotólisis del agua que usa algas o cianobacterias y la fermentación oscura (*dark fermentation*) de compuestos orgánicos con microorganismos, que actúan como biocatalizadores, permiten producir hidrógeno a baja temperatura (37 °C) evitando las etapas de reformado catalítico o de gasificación que consumen mucha energía. El rendimiento energético máximo (conversión de la biomasa en hidrógeno) del procedimiento de fermentación oscura es del 67 % (en la práctica, del 15 al 33 %), un valor muy superior al del procedimiento de fotólisis del agua.

La producción de H₂ por procedimientos biológicos, como la fermentación oscura, consume menos energía y puede realizarse en condiciones no estériles, usando cultivos mixtos y residuos orgánicos poco costosos como sustratos [7]. La conversión de residuos orgánicos en H₂ implica una comunidad microbiana compleja que usa diferentes vías metabólicas. El rendimiento teórico máximo en H₂ a partir de 1 mol de hexosa es de 4 mol_{H₂}.mol⁻¹_{hexosa} por medio de la vía del acetato (ecuación 1) y 2 mol_{H₂}.mol⁻¹_{hexosa} por medio de la vía del butirato (ecuación 2) [8, 9]. El rendimiento experimental puede alcanzar un límite de 2,5 mol_{H₂}.mol⁻¹_{hexosa} (ecuación 3) cuando intervienen diferentes vías metabólicas (combinación de la vía de acetato y butirato) [10]. La razón molar butirato/acetato (B/A) puede estimar la conformidad de la ecuación 3 en la que lo óptimo es 3/2. Estos rendimientos son posibles solo si la presión parcial en H₂ es baja y si se inhiben los microorganismos que consumen H₂, como las arqueas metanógenas o las bacterias homoacetógenas (ecuación 4). El tratamiento térmico es uno de los tratamientos más usados para inhibir los microorganismos que consumen H₂ y aumenta específicamente el crecimiento de bacterias esporuladas que producen H₂. Fuera de las vías de producción y de consumo de H₂, las vías competitivas como la vía etanólica (ecuación 5) pueden estar implicadas en el curso de la fermentación anaerobia.





Sin embargo, en la bibliografía, los lodos o aguas usadas se usan a menudo como inóculo, y muy pocos autores han estudiado la fermentación oscura a partir de residuos orgánicos sin el uso de cultivos mixtos adicionales.

Marone y col. (Renewable Energy 68:6-13, 2014) describen la producción de hidrógeno por fermentación oscura de residuos de verduras, sin tratamiento térmico, y sin la adición de un inóculo.

Además, el coste del hidrógeno está relacionado principalmente con su transporte. De hecho, el coste de producción industrial del hidrógeno se eleva a 2 € por kg de hidrógeno obtenido por reformado por vapor del metano; a este coste se le añade sin embargo el de la distribución hasta el usuario, en función de las distancias que se han de recorrer y de la densidad de los lugares de entrega. Desde una óptica de descentralización de la producción del hidrógeno el procedimiento de fermentación oscura de biomasa u otros procedimientos de producción de hidrógeno podrían hacerse competitivos y la producción descentralizada de hidrógeno a partir del gas natural tendría en esta configuración un coste mínimo de 6 € por kg de hidrógeno [11].

Por tanto, existe una necesidad real de poner a punto un nuevo procedimiento de producción de hidrógeno ecológico, eficaz y que consuma poca energía para paliar los defectos, inconvenientes y obstáculos de la técnica anterior, en particular un procedimiento que permita producir hidrógeno con un buen rendimiento, sin producción de metano, sin tener que hacer uso de inóculo de cultivos mixtos, y reducir los costes.

Descripción de la invención

Los autores de la invención han puesto así de relieve de forma totalmente inesperada una producción eficaz de hidrógeno en diversas biomasa vitivinícolas obtenidas de varios suelos sin aporte de inóculo microbiano, sin aporte nutricional adicional ni pretratamiento térmico; mientras tanto, los trabajos descritos en la bibliografía usan sistemáticamente un inóculo de cultivos mixtos con rendimientos inferiores a los obtenidos con el procedimiento de la invención.

El procedimiento de la invención está constituido por los primeros trabajos de valoración de biomasa vitivinícolas, todavía no exploradas para algunos hoy en día (por ejemplo, fangos, orujos, aguas de lavado de los lagares, aguas de lavado de las cubas de desfangado), para la producción de hidrógeno por el proceso biológico de fermentación oscura. De forma global, el procedimiento de fermentación oscura consume poca energía comparativamente con los procedimientos de valoración actuales como la destilación de orujos y fangos para la producción de etanol. El consumo energético para la aplicación de la fermentación se basa esencialmente en el mantenimiento del reactor en isoterma (temperatura a 37 °C) y la puesta en suspensión de la biomasa por agitación.

El procedimiento de la invención permite así producir hidrógeno con buenos rendimientos sin producción de metano, sin tener que hacer uso de inóculo de cultivos mixtos pero usando el consorcio microbiano endógeno presente en la biomasa vitivinícola, y sin pretratamiento térmico. De hecho, el procedimiento de producción pone de relieve una selección de microorganismos productores de hidrógeno forzada por las condiciones de aplicación del biorreactor de semilotes (extracción de gases producidos, funcionamiento en anaerobiosis y en oscuridad, condiciones de pH y temperatura controladas). Los resultados muestran que los consorcios microbianos presentes en la biomasa son los más adaptados para metabolizar los azúcares constitutivos de esta en hidrógeno (fangos: rendimiento medio de 2,0 mol de H₂/mol de hexosa; orujo de uva: rendimiento medio de 1,4 mol de H₂/mol de hexosa). De hecho, los datos de la bibliografía en la fermentación oscura de uvas maduras en presencia de cultivos mixtos (consorcio microbiano exógeno) refieren un rendimiento de solo 0,1 mol de H₂/mol de hexosa [12], muy inferior a los obtenidos por el procedimiento de la invención. Además, salvo la regulación del pH del medio de reacción a un valor optimizado, no es necesario ningún tratamiento térmico para seleccionar los microorganismos buscados en el procedimiento de la invención. Mientras que, de una forma general, en los procedimientos de fermentación de la técnica en presencia de un consorcio microbiano complejo (como puede encontrarse en los lodos de estación de depuración (STEP)), es necesario un tratamiento térmico antes de la fermentación para inhibir la actividad de los organismos hidrogenótrofos o competidores de la producción de hidrógeno y aumentar así el rendimiento de producción de hidrógeno.

La presente invención tiene así por objetivo un procedimiento de producción de hidrógeno que comprende la fermentación oscura de biomasa vitivinícolas, sin adición de inóculo microbiano y sin pretratamiento térmico.

Por «fermentación oscura» en el sentido de la presente invención, se entiende la fermentación anaerobia que consiste en la transformación por fermentación de sustratos orgánicos en biohidrógeno. Se trata de un proceso complejo realizado por diversos grupos de microorganismos, que implica una serie de reacciones bioquímicas que usan tres etapas similares de la digestión anaerobia. La fermentación oscura difiere de la fotofermentación en que se desarrolla en ausencia de luz.

Según una realización en particular del procedimiento de la invención, no se aporta ningún aporte nutricional adicional a la biomasa.

Según una realización en particular del procedimiento de la invención, la biomasa vitivinícola se elige entre los fangos de uva, los orujos de uva, los depósitos de vino, los orujos agotados, las tortas de filtrado, las aguas de lavado de los materiales de recolección, selección y vinificación. La biomasa vitivinícola puede provenir de una o varias fuentes diferentes, por ejemplo de fangos de uva y de aguas de lavado. Esta biomasa, obtenida de la industria vitícola, se refiere a todas las uvas usadas para la vinificación por prensado de la cosecha con independencia del color de la uva sin restricción de variedad o de suelo. Por ejemplo, la biomasa vitivinícola puede obtenerse de fangos, orujos de uva y/o aguas de lavado de lagares, tortas de filtrado, depósitos de vino, que provienen de diversos suelos (Alsacia, Borgoña) y/o aguas de lavado de lagares; y cuya uva proviene de variedades diversificadas (Moscatel, Auxerrois, Pinot gris, Gewurztraminer, Riesling, Pinot negro, Chardonnay, Pinot negro/Chardonnay o Aligoté).

Según una realización en particular del procedimiento de la invención, la fermentación se realiza a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Según una realización en particular del procedimiento de la invención, la biomasa vitivinícola puede conservarse por refrigeración o por congelación antes de uso.

Según una realización en particular del procedimiento de la invención, el pH de la biomasa se mantiene por encima de $5,5 \pm 0,2$ durante la fermentación.

Según una realización en particular del procedimiento de la invención, el gas producido por la fermentación de la biomasa se extrae mediante un gas de barrido (nitrógeno, por ejemplo).

Según una realización en particular del procedimiento de la invención, dicho procedimiento puede comprender además una etapa de aislamiento del consorcio microbiano contenido en la biomasa fermentada o en fermentación.

La presente invención tiene por objeto igualmente un procedimiento de obtención del consorcio microbiano, obtenido de la biomasa vitivinícola, que puede obtenerse por el procedimiento de la invención. Por ejemplo, el consorcio microbiano comprende mayoritariamente una flora microbiana que pertenece a los géneros *Enterobacter*/*Klebsiella*/*Kluyvera*/*Buttiauxella* para los orujos y a las especies *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium* spp. (*saccharoperbutylacetonicum*, *beijerinckii*, *puniceum*, *diolis*, *roseum*), *Streptococcus* spp. (*lutetiensis*, *infantarius*, *equinus*, *luteciae*), *Clostridium butyricum* para los fangos.

Otras ventajas serán evidentes para el experto en la materia a partir de la lectura de los ejemplos mostrados a continuación.

Breve descripción de las figuras

- La figura 1 representa la clasificación taxonómica en los niveles de phylum y de familia (a y b) de las muestras extraídas en el curso de la fermentación durante la prueba en la biomasa de fangos de Pinot Gris de Alsacia (cosechas de 2014) almacenada a -20°C durante 47 días (c).

- La figura 2 representa los rendimientos de producción de hidrógeno obtenidos en función del tiempo de almacenamiento a -20°C de la biomasa de fangos de Alsacia Pinot Gris (cosechas de 2014): 35, 47, 63 y 115 días.

- La figura 3 representa la clasificación taxonómica en la familia realizada a partir de muestras extraídas a 24 h de fermentación durante pruebas de «35 días», «47 días» y «63 días» para la biomasa de fangos de Alsacia (Pinot Gris) (cosechas de 2014). La figura 4 representa los rendimientos de producción de hidrógeno obtenidos en función de la carga de biomasa.

- La figura 5 representa la clasificación taxonómica en la familia realizada a partir de muestras extraídas a 24 h de fermentación durante pruebas de «14 g de DCO/L», «28 g de DCO/L», «60 g de DCO/L» y «92 g de DCO/L».

- La figura 6 representa los rendimientos de producción de hidrógeno obtenidos en función del pretratamiento y de la naturaleza del gas de barrido.

- La figura 7 representa la clasificación taxonómica en la familia realizada a partir de muestras extraídas a 24 h de fermentación durante pruebas «sin pt», «ptf» y «ptf + ptc».

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

La fermentación oscura se realizó en un reactor de 1 L de doble envoltura colocado en oscuridad y dotado de un sistema de extracción de gases, que permite al mismo tiempo garantizar las condiciones de anaerobiosis y reducir al mínimo la presión parcial de hidrógeno, que es un inhibidor de la actividad microbiana.

Dispositivo experimental - Equipos

Las pruebas se realizaron en un reactor de 1 L (Büchi AG) agitado, que funciona a presión atmosférica. Está equipado con una doble envoltura conectada a un baño con termostato (Bioblock Scientific) que permite controlar la temperatura en el biorreactor. El pH del medio de reacción se sigue *in situ* con ayuda de una sonda pH-métrica y se ajusta con un regulador de pH (Hanna Instruments BL 7916) conectado al reactor, por inyección de una solución de sosa. El reactor se alimenta con un gas de barrido (nitrógeno) cuyo flujo se regula con un flujómetro másico (Brooks 5850^E) conectado a un regulador (Brooks Instruments 0254). Los gases producidos durante la fermentación, arrastrados por el flujo de nitrógeno en salida del biorreactor, circulan en dos trampas colocadas en serie, refrigeradas a 0 °C con ayuda de un criostato (Huber TC40) para atrapar por condensación los compuestos volátiles que provienen del medio de reacción líquido. La producción de gas es analizada en línea por un microcromatógrafo en fase gaseosa (Agilent M200). El reactor está equipado con una válvula de purga para realizar las tomas necesarias para la cuantificación de los metabolitos identificados y analizados con ayuda de un cromatógrafo en fase gaseosa con un detector de ionización de llama (Agilent GC 7890Q).

Protocolo de implementación y condiciones experimentales

Acondicionamiento y preparación de la biomasa

Las muestras (orujos, fangos, aguas de lavado) se recogieron en suelos, y después se almacenaron a -20 °C para limitar el inicio de procesos de fermentación, salvo para el lote de muestras «nuevas» almacenadas a 4 °C.

Para las aguas de lavado, se colocó en el biorreactor un volumen de 700 mL de aguas de lavado.

Para los fangos, se añadió un volumen de 650 mL de agua de la red de la Comunidad Urbana de Estrasburgo (CUE) o de aguas de lavado a 50 mL de fangos colocadas previamente en el biorreactor para obtener un volumen final de 700 mL. Para los ensayos preliminares, lodos activados (zona anóxica) de la estación de depuración (lodos de STEP) de la Comunidad Urbana de Estrasburgo han sustituido al agua de la red de la CUE con el fin de añadir un inóculo externo.

Para los orujos, se añadió un volumen de 650 mL de agua de la red de la CUE o de aguas de lavado a 50 g de orujos de uva colocados previamente en el biorreactor para obtener un volumen final de 700 mL.

Prueba de fermentación

El pH del medio de reacción (fangos diluidos, orujos diluidos o aguas de lavado) se ajustó inicialmente a 7,0 en el biorreactor con ayuda de una solución de hidróxido de sodio 3 M. Cuando se aplicó un pretratamiento térmico (ht) (ensayos preliminares y orujos diluidos), el medio de reacción experimentó un aumento de temperatura de 15 min hasta 70 °C en atmósfera de aire estático y un tramo de una hora a esta temperatura, al cabo del cual la temperatura disminuyó hasta 37 °C. A continuación se colocó el medio de reacción bajo flujo de nitrógeno con un flujo de 50 mL_{N2}/min, a una temperatura controlada a 37 °C y en agitación a 220 vueltas/min y después en oscuridad. Este flujo de nitrógeno permitió al mismo tiempo garantizar condiciones anaerobias y extraer los gases producidos. Así, la presión parcial de hidrógeno no superó 0,05 bares. Cuando se aplicó la regulación de pH, se inyectaron 0,5 mL de solución de sosa 1 M (salvo para los ensayos a 3 M) cuando el valor de pH fue inferior a 5,50 ± 0,2.

Las pruebas de fermentación se realizaron sin ningún aporte de medio nutritivo adicional (salvo la biomasa vitivinícola).

Análisis

Análisis de gases

El análisis en línea de los gases se garantizó mediante un microcromatógrafo Agilent M200 compuesto por dos módulos equipados con detectores de conductividad térmica (TCD). El primer módulo permitió la detección de N₂, O₂, CH₄ y H₂ y está constituido por una columna de tipo tamiz molecular de 5 Å (10 m x 0,32 m x 30 µm) que usa argón como gas vector. El segundo módulo permitió detectar y cuantificar CO₂ y CH₄ gracias a una columna capilar PoraPlot U (8 m x 0,32 m x 10 µm) constituida por divinilbenceno-etilenglicol como fase estacionaria y usando helio como gas vector.

Análisis de metabolitos

Se analizó la composición en ácidos grasos volátiles (AGV) y en alcoholes de la fase líquida: acetato (C2), propionato (C3), butirato e isobutirato (C4 e iC4), valerato e isovalerato (C5 e iC5), etanol y butanol por cromatografía en fase gaseosa (Agilent 7890Q GC) con un detector de ionización de llama (FID) y una columna FFAP (15 m x 0,1 mm x 0,1 µm) usando el polietilenglicol modificado con ácido nitrotereftálico como fase estacionaria.

Las muestras se centrifugaron previamente a 15.000 vueltas/min durante 15 min, y después se filtraron los sobrenadantes en filtros de jeringa (diámetro de poros de 0,22 µm). A continuación se mezcló cada muestra, diluida 1/4, con ácido trifluoroacético en una concentración de 0,03 M en relación de volumen 1:1 antes de cualquier inyección en el GC-FID para estar a un pH inferior a 2. Se usó helio como gas vector a un flujo de 0,4 mL/min y una presión de 3,6 bares.

Análisis de azúcares

El análisis de azúcares totales se realizó por dosificación colorimétrica con antrón. Se calculó la cantidad de azúcares consumidos realizando la diferencia entre la cantidad inicial y la cantidad final medidas en los sobrenadantes obtenidos por centrifugación a 4.500 vueltas/min durante 30 min de las muestras obtenidas del biorreactor. Para la medida de la cantidad inicial de azúcares contenidos en los orujos de uva se realizó un tratamiento de 4 horas con ultrasonidos.

Análisis cualitativo de la microflora por secuenciación de alto flujo (realizada de forma externa por el INRA Transfert Environnement, Narbona)

Se efectuó el estudio de las poblaciones microbianas presentes en las matrices ADN por pirosecuenciación Roche 454 (secuenciador: química de secuenciación Roche GS FLX + System XLR 70) y por secuenciación Illumina MiSeq del gen del ARN ribosómico 16S presente en todos los genomas microbianos. Los análisis bioinformáticos permitieron tratar los archivos de secuencias en bruto y realizar la identificación de cada secuencia basándose en la taxonomía SILVA. Se realizó una agrupación basándose en homología al 100 % entre dos secuencias y se identificó la secuencia más próxima en la base de datos Genbank.

EJEMPLO 2: POTENCIALIDAD DE LA BIOMASA DE «FANGOS» COMO SUSTRATO Y DEMOSTRACIÓN DE LA PRESENCIA DE UN CONSORCIO MICROBIANO ENDÓGENO PRODUCTOR DE HIDRÓGENO

Se estudió la potencialidad de la biomasa de «fangos» para la producción de hidrógeno como sustrato para inóculo de los cultivos mixtos (CM) urbanos obtenidos de lodos activados (zona anóxica) de la estación de depuración (lodos STEP) de la Comunidad Urbana de Estrasburgo. Se ensayó el efecto del pretratamiento térmico (ht) de la biomasa de «fangos» con cultivos mixtos y sin cultivos mixtos en la producción de hidrógeno.

El primer enfoque relacionado con la experiencia de los autores en el uso de los lodos de STEP fue diluir la biomasa de «fangos» en los lodos de estación de depuración (MES = 4 g/L) y aplicar un pretratamiento térmico a 70 °C que permite la inhibición de bacterias hidrogenótrofas, consumidoras de hidrógeno o de arqueas metanógenas productoras de metano; de hecho, sin tratamiento térmico los cultivos mixtos con adición de un sustrato modelo son muy poco productivos de hidrógeno (rendimiento de H₂ de 0,23 mol de H₂/mol de hexosas consumidas).

Los resultados obtenidos, presentados en la tabla 1, en fangos que provienen de Alsacia (variedad Pinot gris) (PG+CM^{ht}) (prueba 1) y de Borgoña (B+CM^{ht}) (prueba 5) mostraron no solo un volumen producido de hidrógeno elevado relacionado con una concentración de materias metabolizables (azúcares) importante sino sobre todo un rendimiento más elevado respectivamente de 2,31 y 2,21 mol de H₂.mol⁻¹ de hexosas consumidas, que el obtenido con un sustrato modelo (2,10 mol de H₂.mol⁻¹ de hexosas).

El segundo enfoque consistió entonces en probar la biomasa de «fangos» diluida en los lodos de STEP sin aplicar tratamiento térmico (muestras PG+CM y B+CM) (pruebas 2, 6). Se observó un rendimiento de hidrógeno claramente más bajo que para la biomasa tratada térmicamente pero aun así muy significativo, de 2,1 a 3,6 veces más elevado que el obtenido para los cultivos mixtos añadidos de un sustrato modelo y no tratados térmicamente; de manera que la producción de gas es favorable a dióxido de carbono (razón molar H₂/CO₂ baja).

Tabla 1: Rendimientos de la producción de hidrógeno para fangos de Alsacia (variedad Pinot gris (PG) y de Borgoña (B)) (cosechas de 2012) con cultivos mixtos (CM) o sin (agua de la red de la CUE) y con pretratamiento térmico a 70 °C (ht) o sin pretratamiento.

Prueba #	1	2	3	4	5	6	7	8
Variedad de fangos	PG+CM ^{ht}	PG+CM	PG ^{ht}	PG	B+CM ^{ht}	B+CM	B ^{ht}	B
Productividad de H ₂ (mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)								
Rendimiento (mol H ₂ .mol ⁻¹ de hexosas consumidas)	8,18	1,43	5,05	3,80	8,91	4,54	2,38	2,97
	2,31	0,49	1,85	1,18	2,21	0,83	2,12	1,99
Relación butirato/acetato (B/A)	0,30	0,18	2,78	>>>	0,81	0,37	0,33	1,38
Relación H ₂ /CO ₂	0,80	0,24	0,91	0,86	0,95	0,42	1,08	0,88
P (L H ₂ .L ⁻¹ de reactor)	2,09	0,46	3,59	2,78	2,41	0,71	2,57	2,25
P (L H ₂ .L ⁻¹ de fangos)	29,19	6,45	50,31	38,90	33,72	9,87	35,97	31,56

>>>: acetato no detectado

Esta producción de hidrógeno reveladora de una actividad microbiana distinta a la de los lodos de STEP y productora de hidrógeno orientó las experiencias hacia un tercer enfoque mediante la implementación de la biomasa de «fangos» en el biorreactor en ausencia de cultivos mixtos y diluidos en el agua de la red de la Comunidad Urbana de Estrasburgo.

Los resultados de la biomasa de «fangos» diluidos con pretratamiento térmico (PG^{ht} y B^{ht}) (pruebas 3, 7) sin ningún aporte de inóculo microbiano han mostrado una actividad notable con un rendimiento de hidrógeno inferior pero cercano al obtenido para la biomasa de «fangos» con cultivos mixtos, además con un volumen de hidrógeno producido por litro de reactor muy superior específicamente para la biomasa de Alsacia (+72 %). Estos resultados han puesto de relieve una actividad de fermentación endógena en este tipo de biomasa, no explorada en la bibliografía. La razón molar H₂/CO₂ más elevada (+13,7 % para los dos tipos de fangos) reveló la presencia de un consorcio bacteriano selectivo para la producción de hidrógeno.

En una óptica de minimizar los gastos energéticos relacionados con el pretratamiento térmico durante el procedimiento, se realizaron pruebas con la biomasa de «fangos» diluida en el agua sin tratamiento térmico (muestras PG y B) (pruebas 4, 8).

Los resultados han puesto de relieve un rendimiento de hidrógeno claramente más elevado, del 58,5 % y el 58,3 % respectivamente para la biomasa de Alsacia y de Borgoña que los de los fangos añadidos de lodos de la STEP, con una producción de hidrógeno por litro de reactor más importante (prueba 4 con respecto a la prueba 2) o equivalente (prueba 8 con respecto a la prueba 6). Estos primeros ensayos de prueba han testimoniado la existencia de consorcios microbianos en la biomasa vitivinícola de tipo «fangos»; lo que desempeña el papel al mismo tiempo de sustrato y de inóculo microbiano durante la reacción de fermentación, no necesariamente mesófila y sin selección microbiana específica. Esta fuerte potencialidad, mostrada por primera vez, dio lugar a ensayos para los que no fue necesario ningún tratamiento térmico a 70 °C.

EJEMPLO 3: RENDIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO PARA LA BIOMASA DE «ORUJOS»

Los orujos de uva obtenidos de cosechas de 2012 provenientes de diferentes variedades obtenidas de diferentes suelos (Alsacia (Dominio Pfister, Dahlenheim) y Borgoña (Dominio de la Universidad de Borgoña)) se han usado como sustrato e inóculo microbiano. Los parámetros sometidos a ensayo son el impacto de compuestos lignocelulósicos que provienen de raspones de racimos de uva en la producción de hidrógeno así como el pretratamiento térmico a una temperatura de 70 °C. Los resultados de producción se recogen en la tabla 2.

Tabla 2: Producción de hidrógeno para diferentes orujos de uva (cosechas de 2012), almacenados a -20 °C y en diferentes condiciones: Moscatel de Alsacia (A_M), Moscatel de Alsacia sin raspones (A_M^{SR}), Moscatel de Alsacia pretratado térmicamente (A_M^{ht}), Auxerrois de Alsacia (A_A), Pinot Negro de Borgoña (B_{PN}), mezcla Pinot Negro/Chardonnay de Borgoña (B_{PC}) y Aligoté de Borgoña (B_A).

Prueba #	1	2	3	4	5	6	7	8
Muestra de orujos de uva	A_M^{SR}	A_M	A_M^{ht}	A_M	A_A	A_{PN}	B_{PC}	B_A
Concentración NaOH	3 M	3 M	3 M	1 M	1 M	1 M	1 M	1 M
Productividad de H_2 ($mmol.L^{-1}.h^{-1}$)	3,86	4,75	3,46	4,75	4,16	4,45	5,33	5,05
Rendimiento de H_2 (mol de $H_2.mol^{-1}$ hexosas consumidas)	1,34	1,61	1,13	1,62	1,02	1,45	1,33	1,42
Razón molar butirato/acetato (B/A)	0,07	0,12	0,29	0,11	<0,01	0,01	0,12	0,06
Razón molar H_2/CO_2	0,86	0,89	0,65	0,82	0,79	0,81	0,66	0,72
P (L de $H_2.kg^{-1}$ orujos de uva)	29,44	30,87	22,15	27,86	22,34	23,22	21,88	19,69
P (L de $H_2.L^{-1}$ reactor)	1,48	2,21	1,59	2,00	1,61	1,66	1,57	1,42

La comparación de la biomasa compuesta por orujos de Moscatel (A_M^{ht}) pretratados térmicamente o no (A_M) (pruebas 3 y 2) puso de relieve una productividad y un rendimiento más bajos de hidrógeno para la biomasa pretratada con una razón molar butirato/acetato significativamente más elevada lo que puede explicar una relación H_2/CO_2 claramente más baja (0,65 frente a 0,89). Este resultado avaló la idea según la cual la etapa de tratamiento a 70 °C que realiza potencialmente una selección de bacterias termófilas no aportaba ningún efecto positivo para este tipo de muestra y constituye una etapa suplementaria que consume energía.

Debe observarse que la concentración de la solución en sosa inyectada (3 M y 1 M) para la regulación de pH (pruebas 2, 4) tuvo un efecto escaso en los rendimientos de producción de hidrógeno y aportó en este caso la información de una muy buena reproductibilidad en cuanto a la velocidad de producción de hidrógeno (productibilidad en hidrógeno a 4,75 $mmol.L^{-1}.h^{-1}$).

Las diferentes variedades de orujos de uva en función de su variedad (pruebas 4, 5, 6, 7, 8) presentaron una productividad de hidrógeno del mismo orden de magnitud con un valor medio de $4,57 \pm 0,51 mmol.L^{-1}.h^{-1}$; un rendimiento de hidrógeno medio de $1,37 \pm 0,22 mol de H_2.mol^{-1}$ de hexosas consumidas, una razón molar H_2/CO_2 de $0,76 \pm 0,07$ y una producción de H_2 de $23,00 \pm 3,01 L de H_2.kg^{-1}$ de orujos de uvas. Los rendimientos más elevados se obtuvieron para los orujos de Moscatel (A_M).

Debe observarse que estos resultados obtenidos a partir de microfloras autóctonas no tratadas térmicamente son comparables (e incluso superiores) a los resultados obtenidos con orujos de manzanas con adición de cultivos mixtos y pretratamiento térmico (18,48 L de $H_2.kg^{-1}$ de orujos de manzanas) [13].

Orujos de uva obtenidos de las cosechas de 2013 provenientes de diferentes variedades obtenidas de distintos suelos:

Se usó Alsacia (Dominio Pfister, Dahlenheim) y Borgoña (Dominio de Poncétys del Lycée Viticole de Macon-Davayé) como sustrato e inóculo microbiano. Los parámetros sometidos a ensayo para las muestras de orujos de Alsacia son la reproductibilidad de un año a otro para una misma variedad (Moscatel), la variación de producción en función de la

naturaleza de la variedad en un mismo dominio y para los de Borgoña, el impacto del modo de tratamiento de la viña para una misma variedad (Chardonnay) y un mismo dominio. Los resultados de producción se recogen en la tabla 3.

- 5 Tabla 3: Producción de hidrógeno para orujos de uva (cosechas de 2013) de Alsacia, almacenados a -20 °C, obtenidos de diferentes variedades: Moscatel (A_M), Pinot Gris (A_{PG}), Gewurztraminer (A_{GW}), Riesling (A_{RI}) y Borgoña (variedad Chardonnay) obtenidos de diferentes modos de tratamiento de cultivos: duradero ($B_{duradero}$), ecofitosanitario ($B_{ecofito}$) y biológico (B_{bio}).

Prueba #	1	2	3	4	5	6	7
Muestra de orujos de uva	A_M	A_{PG}	A_{GW}	A_{RI}	$A_{duradero}$	$B_{ecofito}$	B_{bio}
Productividad de H_2 (mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)	4,45	3,60	2,87	2,97	3,86	4,75	4,45
Rendimiento de H_2 (mol de H_2 .mol ⁻¹ hexosas consumidas)	1,50	1,05	1,24	1,46	1,09	1,00	1,21
Razón molar butirato/acetato (B/A)	0,06	0,16	0,41	0,42	0,16	0,07	0,09
Relación H_2/CO_2	0,74	0,53	0,54	0,58	0,74	0,53	0,66
P (L de H_2 . kg ⁻¹ orujos de uva)	23,00	15,65	16,95	15,15	24,57	21,25	21,85
P (L de H_2 . L ⁻¹ reactor)	1,63	1,12	1,25	1,12	1,81	1,56	1,58

- 10 Debe observarse que, para orujos de uva de una misma variedad (Moscatel) en un mismo dominio vendimiados en 2012 (prueba 4 tabla 2) y 2013 (prueba 1 tabla 3), los parámetros de producción y de productividad de hidrógeno son muy próximos entre sí (separación del 6,2 % en el rendimiento de H_2 , el 6,3 % en la productividad y el 16,8 % en la relación H_2/CO_2). Este resultado puso de relieve la regularidad de la producción de un año a otro al menos en este ensayo y la muy buena sensibilidad con la que se efectuaron las medidas.
- 15 Las diferentes variedades de orujos de uva de Alsacia en función de su variedad (pruebas 1, 2, 3, 4) presentaron una productividad de hidrógeno con un valor medio de $3,47 \pm 0,73$ mmol.L⁻¹.h⁻¹, un rendimiento de hidrógeno medio de $1,32 \pm 0,21$ mol de H_2 .mol⁻¹ de hexosas consumidas, una razón molar H_2/CO_2 de $0,60 \pm 0,10$ y una producción de H_2 de $17,69 \pm 3,62$ L de H_2 .kg⁻¹ de orujos de uva. Los mejores resultados se obtuvieron para la variedad Moscatel.
- 20 Los diferentes modos de tratamiento de los cultivos aplicados a los orujos de Chardonnay de Borgoña (pruebas 5, 6, 7) tuvieron un impacto escaso en el rendimiento de hidrógeno. Debe observarse para las 3 muestras una producción por kg de orujos de uva igualmente próxima.
- 25 Los parámetros suplementarios sometidos a ensayo en los orujos de Alsacia son el efecto de la adición de las aguas de lavado de los lagares a los orujos «nuevos» almacenados en frío (4 °C) en duraciones (en días) equivalentes para diferentes variedades y la comparación con las muestras conservadas a -20 °C (tf). Los resultados de producción se recogen en la tabla 4.
- 30 Tabla 4: Rendimientos de producción de hidrógeno para orujos de Alsacia (cosechas de 2013) para diferentes variedades con (ww) aguas de lavado en muestras nuevas (almacenadas a 4 °C) comparadas con las de orujos de uva con tratamiento en frío (-20 °C) (tf): Pinot Gris (A_{PG} , $A_{PG-ww-12j}$, $A_{PG-ww-50j}$, A_{PG-tf}), Gewurztraminer (A_{GWW} , A_{GW-tf}) y Riesling ($A_{RI-ww-44j}$, A_{RI-tf}).

Prueba #	1	2	3	4	5	6	7
	$A_{PG-ww-12j}$	$A_{PG-ww-50j}$	A_{PG-tf}	$A_{GW-ww-56j}$	A_{GW-tf}	$A_{RI-ww-44j}$	A_{RI-tf}
Variedad de orujos							
Productividad de H_2 (mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)	1,37	0,45	3,60	2,67	2,87	2,91	2,97
Rendimiento (mol de H_2 .mol ⁻¹ hexosas consumidas)	2,54	1,93	1,05	-	1,24	-	1,46
Relación butirato/acetato (B/A)	0,69	0,44	0,16	0,70	0,41	0,37	0,42
Relación H_2/CO_2	0,41	0,28	0,53	0,46	0,54	0,54	0,58
P (L H_2 .L ⁻¹ de reactor)	0,78	0,32	1,12	1,10	1,25	0,99	1,12

(continuación)

P (L de H ₂ . kg ⁻¹ orujos de uva)	10,87	4,44	15,65	15,33	16,95	13,86	15,15
Acetato (mmol.L ⁻¹)	10,0	11,4	10,5	20,6	10,4	28,0	9,5
Butirato (mmol.L ⁻¹)	6,9	5,0	1,7	14,4	4,2	10,5	4,0
Etanol (mmol.L ⁻¹)	19,0	22,2	16,3	2,0	15,1	12,3	12,9

Para los orujos de uva obtenidos de variedad Pinot gris añadidos a aguas de lavado, se observó que para estas muestras se obtuvieron los mejores rendimientos de hidrógeno con respecto al conjunto de las muestras sometidas a ensayo anteriormente poniendo de relieve que la microflora presente en los orujos «nuevos» es la más adaptada para metabolizar los azúcares de la biomasa y para producir hidrógeno. Se constató igualmente que la duración del almacenamiento a 4 °C (pruebas 1 y 2) tiene un impacto en los rendimientos de producción de hidrógeno; se observó un descenso importante de la productividad (67,1 %), un rendimiento de hidrógeno y una relación H₂/CO₂ reducidas respectivamente en el 24,0 % y el 31,7 % mientras que los contenidos en metabolitos variaron poco. Los análisis de gases en muestras de orujos acondicionadas a 4 °C mostraron que de hecho, durante el almacenamiento, la fermentación tuvo lugar con una producción muy mayoritaria de CO₂. Para esta misma variedad, la comparación con la biomasa almacenada en frío (-20 °C) (prueba 3) mostró una velocidad de producción de H₂ más intensa para esta muestra mientras que el rendimiento se redujo más de la mitad y la producción de hidrógeno por litro de reactor se mantuvo. Estos resultados mostraron que este tratamiento en frío tiene un efecto en el consorcio microbiano productor de hidrógeno. Para los orujos de Gewurztraminer y de Riesling, a pesar de un almacenamiento con una duración de 44 y 56 días, los rendimientos en términos de producción de hidrógeno son buenos, para el Riesling (prueba 6) con un contenido del medio de reacción más alto en acetato con respecto a las otras pruebas.

EJEMPLO 4: RENDIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO PARA LA BIOMASA DE «FANGOS»

Al igual que para la biomasa de «orujos», los fangos obtenidos de las cosechas de 2013 provenientes de diferentes variedades obtenidas de distintos suelos: Alsacia (Dominio Pfister, Dahlenheim) y Borgoña (Dominio de Poncétys del Lycée Viticole de Macon-Davayé) se usaron como sustrato e inóculo microbiano. Los parámetros sometidos a ensayo en un primer momento para las muestras de fangos de Alsacia son la variación de producción en función de la naturaleza de la variedad en un mismo dominio, el efecto relacionado con el almacenamiento en frío (-20 °C) y el efecto de la dilución de los fangos con las aguas de lavado de lagar correspondientes.

Los resultados recogidos en la tabla 5 mostraron que con independencia de la variedad, en las muestras de fangos «nuevas» almacenadas a 4 °C (pruebas 1, 4, 7), el rendimiento de hidrógeno fue superior a 1,4 mol de H₂.mol⁻¹ de hexosas con una razón molar H₂/CO₂ más elevado que para los orujos de uva. El consorcio microbiano de la biomasa Pinot Gris permitió obtener la productividad más elevada 10,04 mmol.L⁻¹.h⁻¹ y la biomasa Gewurztraminer permitió la producción de hidrógeno más fuerte (55,00 L de H₂.L⁻¹ de fangos) relacionada con un contenido en azúcares importante; el análisis de los metabolitos puso igualmente de relieve una razón molar butirato/acetato más elevada. En comparación con las pruebas realizadas en los orujos de uva, se observó también una productividad de hidrógeno mucho más elevada para la biomasa de «fangos», significativa de poblaciones microbianas especialmente activas o mucho más concentradas.

Debe observarse que los resultados de este trabajo obtenidos con microfloras endógenas son comparables a los obtenidos por fermentación oscura a partir de frutas maduras añadiendo a la biomasa cultivos mixtos (3,8-4,5 L de H₂.L⁻¹ de reactor y 1,7-2,2 mol.mol⁻¹) [2].

Tabla 5: Rendimientos de producción de hidrógeno para fangos de Alsacia (cosechas de 2013) para diferentes variedades con (ww) o sin aguas de lavado en muestras «nuevas» (almacenadas a 4 °C) o con tratamiento en frío (-20 °C) (tf): Pinot Gris (PG, PG_{ww}, PG^{tf}), Gewurztraminer (Gw, Gw_{ww}, Gw^{tf}) y Riesling (Ri, Ri_{ww}, Ri^{tf}).

Prueba #	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Variedad de fangos	PG	PG _{ww}	PG ^{tf}	Gw	Gw _{ww}	Gw ^{tf}	Ri	Ri _{ww}	Ri ^{tf}
Productividad de H ₂ (mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)	10,04	7,64	6,53	7,13	7,13	5,05	5,64	5,70	4,63
Rendimiento (mol de H ₂ .mol ⁻¹ hexosas consumidas)	1,45	1,68	2,46	2,28	1,60	2,24	2,26	1,52	2,47
Relación butirato/acetato (B/A)	0,97	1,09	0,96	1,35	1,37	1,11	0,78	0,83	0,96
Relación H ₂ /CO ₂	0,82	0,62	0,88	0,94	0,69	0,95	0,87	0,62	0,88
P (L H ₂ .L ⁻¹ de reactor)	3,02	3,20	4,45	3,93	3,70	3,99	2,79	3,10	3,39

(continuación)

P (L H ₂ .L ⁻¹ de fangos)	42,33	44,77	62,28	55,00	51,76	55,86	39,12	43,46	47,49
Acetato (mmol.L ⁻¹)	37,5	32,0	43,9	33,8	30,5	45,1	36,8	35,1	37,7
Butirato (mmol.L ⁻¹)	36,5	35,0	42,0	45,4	42,0	49,9	28,5	29,0	36,1
Etanol (mmol.L ⁻¹)	10,1	43,2	8,8	5,2	27,7	2,4	6,5	36,8	4,1

El uso de aguas de lavado que sirven para diluir los fangos (pruebas 2, 5, 8) puso de relieve una disminución del rendimiento de hidrógeno (de $2,00 \pm 0,47$ mol.mol⁻¹ a $1,60 \pm 0,08$ mol.mol⁻¹) para las 3 variedades (Pinot Gris, Gewurztraminer, Riesling) así como un descenso de la productividad específicamente para la variedad Pinot Gris (de 10,04 a 7,64 mmol.L⁻¹.h⁻¹). Sin embargo, la producción de hidrógeno por litro de reactor se mantuvo casi equivalente aun cuando la cantidad de azúcares era lógicamente más elevada con la adición de las aguas de lavado. Por otra parte, se observó que la producción de etanol se favorecía induciendo una razón molar H₂/CO₂ más baja (en promedio 0,64 y 0,88 respectivamente con y sin las aguas de lavado). Pudo plantearse la existencia de consorcios microbianos en las aguas de lavado que entran en competencia con las presentes en los fangos para metabolizar los azúcares.

El tratamiento en frío (-20 °C) de la biomasa de «fangos» (pruebas 3, 6, 9) indujo, con respecto al obtenido para la biomasa «nueva», un aumento en promedio del rendimiento de hidrógeno (de $2,00 \pm 0,47$ mol.mol⁻¹ a $2,31 \pm 0,13$ mol.mol⁻¹) y de la producción de hidrógeno para cada una de las 3 variedades probadas; las velocidades de producción fueron menores.

Se sometió a ensayo la reproductibilidad en materia de producción de hidrógeno de un año al otro para una misma variedad (Pinot Gris) así como el efecto de un almacenamiento a 4 °C (duración de 7 días y 35 días) frente a un almacenamiento a -20 °C (tf), la variación de producción en función de la duración del almacenamiento en frío más allá de 6 meses (en dos biorreactores diferentes) y para las muestras de Borgoña, el impacto del modo de tratamiento de la viña para una misma variedad (Chardonnay) y un mismo dominio. Los resultados de producción se recogen en la tabla 6.

Los fangos de Pinot Gris del mismo dominio tomados en un estado de conservación semejante (almacenados a 4 °C) (pruebas 2, 3) dieron lugar de un año al otro a una productividad de hidrógeno equivalente, una producción más elevada en 2012 mientras que el rendimiento de hidrógeno para el lote 2013 era casi el doble del de 2012. Se observó igualmente el efecto positivo de la conservación a -20 °C (prueba 3, 4) en el rendimiento, la productividad y la producción de hidrógeno para las muestras de cosechas de 2012.

La conservación de la biomasa a 4 °C de 7 días a 35 días (pruebas 1, 2) tuvo principalmente un efecto en la productividad de hidrógeno, que pasó de 10,04 a 3,56 mmol.L⁻¹.h⁻¹ con una producción de hidrógeno más baja relacionada con el consumo de azúcares metabolizables durante la conservación de la muestra.

Tabla 6: Rendimientos de producción de hidrógeno para fangos de Alsacia (cosechas de 2012-2013) para la variedad Pinot Gris en muestras almacenadas a 4 °C en duraciones variables (PG_{7j(2013)}, PG_{35j(2013)}, PG_{28j(2012)}), de muestras tratadas en frío (-20 °C) (PG_{tf27j(2012)}, PG_{tf}) y muestras almacenadas durante más de 6 meses y sometidas a ensayo simultáneamente en dos reactores de configuraciones diferentes (PG_{tfbis}, PG_{tfter}).

Prueba #	1	2	3	4	5	6	7
Variedad de fangos	PG _{7j} (2013)	PG _{35j} (2013)	PG _{28j} (2012)	PG _{tf27j} (2012)	PG _{tf}	PG _{tfbis}	PG _{tfter}
Productividad de H ₂ (mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)	10,04	3,56	3,80	5,05	6,53	4,16	2,38
Rendimiento (mol de H ₂ .mol ⁻¹ hexosas consumidas)	1,45	2,39	1,18	1,76	2,46	*	*
Relación butirato/acetato (B/A)	0,97	0,51	>>>	1,09	0,96	*	*
Relación H ₂ /CO ₂	0,82	0,75	0,86	0,90	0,88	0,81	0,74
P (L H ₂ .L ⁻¹ de reactor)	3,02	1,91	2,78	3,67	4,45	3,53	2,86
P (L H ₂ .L ⁻¹ de fangos)	42,33	26,68	38,90	51,41	62,28	49,44	40,01
Acetato (mmol.L ⁻¹)	37,5	33,0	0	26,6	43,9	*	*
Butirato (mmol.L ⁻¹)	36,5	17,0	24,6	28,9	42,0		*

(continuación)

Etanol (mmol.L ⁻¹)	10,1	22,7	10,3	5,8	8,8	*	*
--------------------------------	------	------	------	-----	-----	---	---

>>>: acetato no detectado *: en curso de análisis

Los fangos de Pinot Gris conservados a -20 °C durante más de 6 meses se pusieron en marcha en dos biorreactores diferentes que tenían configuraciones próximas, uno de ellos usado para todos los ensayos realizados (PG^{f_{bis}}), y el otro de instalación nueva situado en otro edificio (PG^{f_{ter}}). Los primeros datos (tabla 6) testimoniaron que la biomasa almacenada durante más de 6 meses a -20 °C está siempre activa para la producción de hidrógeno y por otra parte, que la biomasa implementada en un reactor nuevo estuvo igualmente activa descartando así cualquier hipótesis de contaminación. La producción de hidrógeno para las pruebas 6, 7 fue más baja que para el ensayo (prueba 5), explicable potencialmente por una cantidad menor de material para metabolizar (reducción del contenido en azúcares) o por un envejecimiento de la biomasa (hipótesis para plantear en análisis ulteriores). La prueba realizada en el nuevo reactor (prueba 7) puso de relieve en primera aproximación una producción de hidrógeno menos eficaz, lo que puede atribuirse a un modo de extracción de los gases no optimizado y a la existencia de una pala de cizalla suplementaria en el biorreactor.

Los fangos de Chardonnay de Borgoña obtenidos de diferentes modos de tratamiento de los cultivos (tabla 7) (pruebas 1,3, 5) tuvieron un impacto más mesurado en el rendimiento de hidrógeno (comprendido entre 1,80 y 2,18 mol.mol⁻¹), que para los orujos de uva correspondientes. El mejor rendimiento de hidrógeno se obtuvo, de igual modo que para los orujos de uva, para la muestra que se sometió al tratamiento ecofitosanitario con la razón molar butirato/acetato más elevada (2,32). Para las 3 muestras debe observarse una producción por litro de fangos muy próxima (50,58 ± 2,87 L de H₂.L⁻¹ de fangos) y productividades del mismo orden de magnitud (3,52 ± 0,37 mmol.L⁻¹.h⁻¹).

Tabla 7: Rendimientos de producción de hidrógeno para fangos de Borgoña (cosechas de 2013) (variedad Chardonnay), almacenados a -20 °C, obtenidos de diferentes modos de tratamiento de los cultivos: duradero (B_{duradero}), ecofitosanitario (B_{ecofito}) y biológico (B_{bio}) con (ww) y sin las aguas de lavado.

Prueba #	1	2	3	4	5	6
	Ch _{duradero}		Ch _{ecofito}	Ch _{bio}	Ch _{ww-ecofito}	Ch _{ww-bio}
Variedad de fangos	Ch _{duradero}	Ch _{ww-duradero}	Ch _{ecofito}	Ch _{ww-ecofito}	Ch _{bio}	Ch _{ww-bio}
Productividad de H ₂ (mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)	3,86	7,52	3,56	6,53	3,13	5,23
Rendimiento (mol de H ₂ .mol ⁻¹ hexosas consumidas)	1,80	1,66	2,18	1,88	1,71	2,00
Relación butirato/acetato (B/A)	2,21	1,48	2,32	2,24	2,11	2,52
Relación H ₂ /CO ₂	0,96	0,91	0,91	0,95	0,89	0,99
P (L H ₂ .L ⁻¹ de reactor)	3,73	3,47	3,73	5,34	3,38	4,07
P (L H ₂ .L ⁻¹ de fangos)	52,24	48,64	52,24	74,76	47,27	57,00
Acetato (mmol.L ⁻¹)	19,9	20,8	20,6	28,5	15,9	16,3
Butirato (mmol.L ⁻¹)	43,9	30,9	47,7	63,8	33,6	41,1
Etanol (mmol.L ⁻¹)	1,5	7,9	4,7	1,7	10,0	4,2

El uso de las aguas de lavado añadidas a los fangos de Borgoña obtenidos de diversos modos de cultivos del viñedo tuvo como resultado aumentar muy significativamente la productividad de hidrógeno (6,43 ± 1,15 mmol.L⁻¹.h⁻¹ con aguas de lavado). Para las muestras que se sometieron al tratamiento ecofitosanitario y biológico, debe observarse un aumento sustancial de la producción por litro de fangos con respecto a las pruebas sin aguas de lavado, respectivamente del 43,1 % y el 19,9 %. Para estas muestras, se observó igualmente una relación H₂/CO₂ elevada, respectivamente de 0,95 y 0,99.

EJEMPLO 5: RENDIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO PARA LA BIOMASA DE «AGUAS DE LAVADO»

Los resultados expuestos en la tabla 8 muestran que las aguas de lavado de Alsacia (variedad Pinot Gris y Gewurztraminer) poco ricas en materiales metabolizables (contenido de hexosa muy bajo) (pruebas 1 y 2) presentan una actividad en producción de hidrógeno muy baja con una razón molar H₂/CO₂ muy favorable a la producción de dióxido de carbono, significativa de una producción por solventogénesis.

Tabla 8: Rendimientos de producción de hidrógeno para aguas de lavado (ER) de Alsacia (cosechas de 2013) para

diferentes variedades (Pinot Gris (PG), Gewurztraminer (Gw), Riesling (Ri)) y de Borgoña (cosechas de 2012) (tf).

Prueba #	1	2	3	4	5	6
Variedad de aguas de lavado	ER _{PG}	ER _{GW}	ER _{RI}	ER _{PN} ^{TF}	ERB1 ^{tf}	ERB2 ^{tf}
Productividad de H ₂ (mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,12	0,01	0,30	1,78	2,73	2,63
Rendimiento (mol de H ₂ .mol ⁻¹ hexosas consumidas)	-	0,08	1,19	0,90	1,77	0,55
Relación H ₂ /CO ₂	0,09	0,03	0,42	0,90	0,90	0,91
P (L H ₂ .L ⁻¹ de reactor)	0,03	0,009	0,38	0,72	1,66	1,17
Contenido de hexosa (g/L)	0,5	0,9	2,4	6,1	7,1	15,9

Cuando las aguas de lavado estaban más concentradas en azúcares (pruebas 4,5 y 6) y acondicionadas en frío (-20 °C), el rendimiento de hidrógeno, aunque en general inferior al obtenido en las diversas muestras de orujos de uva diluidos y sobre todo en los fangos diluidos, reveló la actividad de un consorcio microbiano endógeno favorable a la producción de hidrógeno; siendo la relación H₂/CO₂ de 0,90.

Estos resultados pusieron de relieve que el sustrato y el consorcio microbiano están presentes igualmente en las aguas de lavado y esto ha sugerido la necesidad de recuperar las aguas de primer lavado de los lagares con el fin de concentrar al máximo los materiales metabolizables de la biomasa para tratamiento.

EJEMPLO 6: RENDIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO PARA LAS BIOMASAS DE «TORTA DE FILTRADO» Y «DEPÓSITOS»

Los resultados expuestos en la tabla 9 muestran los rendimientos de producción de hidrógeno obtenidos para diferentes biomاسas obtenidas del tratamiento vitivinícola: fangos (B), torta de filtrado (G) y depósitos de cuba de vinificación (L) de un mismo dominio (Alsacia) y para una misma variedad (Riesling).

Tabla 9: Rendimientos de producción de hidrógeno para biomاسas de Alsacia-variedad Riesling (Ri) (cosechas de 2014): Fangos (B), Torta de filtrado (G) y Depósitos (L).

Prueba #	1	2	3
Naturaleza de la biomasa (2014)	B _{RI}	G _{RI}	L _{RI}
Productividad de H ₂ (mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)	2,97	1,78	1,78
Rendimiento (mol de H ₂ .mol ⁻¹ hexosas consumidas)	2,13	1,35	*
Relación H ₂ /CO ₂	0,84	0,34	0,37
P (L H ₂ .L ⁻¹ de reactor)	3,25	1,45	0,67
P (L H ₂ .L ⁻¹ de biomasa)	45,53	20,36	3,12
Contenido de hexosa (g. eq. DCO/L)	12,3	8,7	0,2

*valor calculado a partir de las hexosas consumidas: 52,49 mol/mol

Según lo esperado, la biomasa más rica en hexosa (fangos) permite alcanzar la producción en volumen de hidrógeno más importante con una productividad elevada.

Sin embargo, debe observarse que los depósitos aunque sean muy poco ricos en azúcares permiten alcanzar una producción de hidrógeno por litro de reactor 2 veces menor con respecto a la torta de filtrado pero con un contenido en hexosa 43 veces menos elevado y una velocidad de producción de hidrógeno similar.

Al mostrar un rendimiento de hidrógeno atípico, la biomasa de los «depósitos» contiene así material fermentable (aparte de las hexosas) de hidrógeno.

Si bien la razón molar H₂/CO₂ es más baja, el rendimiento de hidrógeno obtenido para la torta de filtrado es equivalente al obtenido para los orujos de uva aun cuando la razón molar H₂/CO₂ sea más baja.

Así, este estudio muestra que el aumento de valor de la torta de filtrado y de los depósitos es posible también para la producción de hidrógeno.

EJEMPLO 7: ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS Y EVOLUCIÓN DURANTE LA FERMENTACIÓN

5 Se realizó un estudio de la evolución de las comunidades microbianas en curso de fermentación en una muestra de biomasa de fangos Pinot gris de Alsacia (cosechas de 2014) almacenada a -20 °C durante 47 días (ptf 47 días).

10 La secuenciación se realizó dirigiéndose a las regiones variables V4-V5 de las secuencias del ARN ribosómico 16S de los procariotas. Se agruparon las secuencias que compartían como mínimo el 97 % de similitud en OTU (unidades taxonómicas operativas) con ayuda del programa de software Mothur. Este porcentaje corresponde a un porcentaje intermedio entre los géneros (96 %) y las especies (98 %) para la mayoría de los géneros bacterianos salvo el género *Bacillus* > 98 %).

15 La taxonomía en el nivel de phylum y la familia de las muestras extraídas se representa en las figuras 1a y 1b en función de la duración de la fermentación y la puesta en paralelo con la producción de hidrógeno (figura 1c).

20 En el estado inicial, *Proteobacteria* es el phylum bacteriano más abundante (45,1 %). Una OTU que tenía una abundancia relativa del 45,3 % se asignó al reino *Plantae* (figura 1a). La comparación de las secuencias representativas de las OTU con la base de datos ambiental (nr_nt) de NCBI mediante el programa de software en línea BLAST permitió asignar estas secuencias a la especie *Vitis vinifera* del reino *Plantae* con el 100,0 % de similitud. Así, en el estado inicial, la biomasa de los «fangos» sometida a ensayo está constituida principalmente por bacterias que pertenecen al phylum *Proteobacteria*.

25 Durante la fermentación, el phylum *Firmicutes* se convierte en el más abundante en detrimento del phylum *Proteobacteria*. De hecho, los valores de abundancias relativas del phylum *Firmicutes* pasan del 1,0 % inicialmente a valores comprendidos entre el 92,3 % (58 h) y el 97,4 % (10 h); y los del phylum *Proteobacteria* pasan del 45,1 % (0 h) a valores comprendidos entre el 0,6 % (34 h) y el 1,8 % (58 h). Las condiciones en las cuales se practica la fermentación oscura permiten «favorecer» las bacterias que pertenecen al phylum *Firmicutes*.

30 Aun cuando el phylum *Firmicutes* sigue siendo el más abundante, la clasificación taxonómica de las secuencias en el taxón evoluciona durante la fermentación (figura 1b). De hecho, inicialmente, la familia *Acetobacteriaceae* (phylum *Proteobacteria*) es la más abundante después de *Vitis vinifera* (35,5 %), y tras 10 h de fermentación, la familia *Clostridiaceae* se convierte en la más abundante (84,3 %) y la abundancia relativa de la familia *Enterococcaceae* aumenta pasando del 0,3 % al 12,9 %. Estas dos familias siguen siendo las principales hasta el fin de la fermentación (58 h) pero con abundancias relativas diferentes. En el curso del tiempo, la abundancia relativa de las *Clostridiaceae* disminuye a la mitad pasando del 84,3 % (10 h) al 40,5 % (58 h) mientras que la de las *Enterococcaceae* aumenta pasando del 12,9 % (10 h) al 20,7 % (58 h). A 34 h otra familia se convierte igualmente en mayoritaria con el 19,3 % de abundancia relativa, las *Sporolactobacillaceae*. La abundancia de esta familia disminuye a la mitad al final de la fermentación (9,7 %) en favor de la familia *Lachnospiraceae* que pasa del 1,4 % (34 h) a una abundancia relativa del 21,0 % (58 h).

EJEMPLO 8: PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO A -20 °C DE LA BIOMASA

45 En la figura 2 se representan los valores de rendimientos de producción de hidrógeno obtenidos en función del tiempo de almacenamiento a -20 °C de la biomasa de fangos de Alsacia Pinot Gris (cosechas de 2014).

50 Los valores de productividades obtenidos a partir de las diferentes pruebas de fermentación varían entre 4,75 y 6,24 mmol/L/h. El valor de productividad obtenido durante la prueba de «47 días» (6,24 mmol/L/h) es el más elevado debido en parte a la concentración inicial en azúcares más elevada para esta prueba (15,5 g equivalente de DCO/L) que para las otras pruebas.

55 Los valores de rendimiento de hidrógeno obtenidos en función de las diferentes duraciones de almacenamiento de la biomasa a -20 °C varían entre 1,67 y 2,02 mol/mol, es decir, una variación del 9 %.

60 Por tanto se observa que la duración del almacenamiento tiene un impacto limitado en la producción de hidrógeno que permite plantear el almacenamiento de la biomasa en una duración importante; las variaciones observadas en los rendimientos de producción son atribuibles potencialmente a la diversidad microbiana y, por consiguiente, a las vías metabólicas usadas por la microflora endógena.

La figura 3 representa las clasificaciones taxonómicas y los índices de diversidad microbiana de las muestras extraídas con 24 h de fermentación cuando la biomasa se almacenó durante 35, 47 y 63 días. Como se ha señalado anteriormente, el phylum *Firmicutes* es el más abundante con valores de abundancias relativas que varían entre el 96,1 % y el 97,4 % respectivamente para «35 días» y «47 días» (figura no representada).

En las familias (figura 3), las pruebas de «35 días» y «47 días» tienen una distribución similar a la familia mayoritaria

Clostridiaceae con el 85,8 % y el 84,3 % de abundancia relativa respectiva, y la familia *Enterococcaceae* es la segunda familia más abundante (respectivamente, el 9,7 % y el 12,9 %). En cambio, las familias *Clostridiaceae* y *Peptostreptococcaceae* son las más abundantes durante la prueba de «63 días», con respectivamente el 80,1 % y el 12,4 %.

En la tabla 10 se presenta la afiliación de las secuencias a la especie o al género microbiano más próximo para las pruebas a 35 días, 47 días y 63 días de almacenamiento de la biomasa a -20 °C.

Tabla 10: Afiliación de las secuencias mayoritarias de ADN que codifican ARNr 16S obtenidos por secuenciación a partir de muestras extraídas con 24 h de fermentación durante las pruebas de «35 días», «47 días» y «63 días».

	Similitud	«35 días»	«47 días»	«63 días»
<i>Clostridium</i> spp. (<i>roseum</i> , <i>diolis</i> , <i>beijerinckii</i> , <i>butyricum</i>)	99,5 %	35,9 %	58,2 %	74,4 %
<i>Clostridium</i> sp.	98,7 %	23,0 %	8,9 %	0,4 %
<i>Clostridium</i> spp. (<i>sartagoforme</i> , <i>tertium</i>)	100,0 %	1,7 %	2,5 %	2,3 %
<i>Clostridium intestinale</i>	99,7 %	25,2 %	0,8 %	3,0 %
[<i>Clostridium</i>] <i>bifermentans</i>	100,0 %	0,2 %	0,1 %	12,4 %
<i>Enterococcus villorum</i>	98,7 %	9,7 %	24,8 %	0,8 %
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100,0 %	0,0 %	0,5 %	2,7 %
<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	100,0 %	0,1 %	1,5 %	0,7 %
<i>Enterobacter/Klebsiella/Proteus</i>	99,7 %	1,2 %	1,3 %	0,1 %

El género afiliado a la secuencia representativa de la OTU dominante en todas las pruebas, es *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) con abundancias relativas del 35,9 %, el 80,1 % y el 74,4 %, respectivamente para las pruebas de «35 días», «47 días» y «63 días». Solo la prueba de «35 días» contiene dos OTU subdominantes afiliadas a *Clostridium intestinale* y *Clostridium* sp. con respectivamente el 25,2 % y el 23,0 % de abundancia relativa. Estas dos especies son minoritarias en las pruebas de «47 días» y «63 días» (abundancias relativas inferiores al 3 %). Las especies intermedias afiliadas a las otras secuencias son: *Enterococcus villorum* con abundancias relativas del 9,7 % y el 12,9 % respectivamente para la prueba de «35 días» y «47 días»; [*Clostridium*] *bifermentans* con una abundancia relativa del 12,4 % para la prueba de «63 días». Los filotipos bacterianos minoritarios presentes en todas las pruebas son principalmente *Clostridium* spp. (*sartagoforme*, *tertium*), *Leuconostoc mesenteroides* y los filotipos bacterianos entéricos que pertenecen a la familia de las *Enterobacteriaceae* con abundancias relativas inferiores al 2,7 %.

En conclusión, cuanto más largo es el tiempo de almacenamiento más mayoritario es *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*), lo que significa que esta bacteria es resistente a la congelación hasta 63 días de almacenamiento al contrario que *Clostridium* sp., influido por el tiempo de congelación. Los datos de rendimientos mostraron que la producción de hidrógeno no se veía afectada por el tiempo de almacenamiento, aunque las abundancias relativas de estas especies sean diferentes. Así, *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) no son los únicos tipos de bacterias responsables de la producción de hidrógeno. De hecho, *Clostridium intestinale* y varias cepas que no se han caracterizado taxonómicamente de manera formal (*Clostridium* sp.) son capaces de producir hidrógeno. [*Clostridium*] *bifermentans* presente en la prueba de «63 días» fermenta al mismo tiempo los azúcares y los aminoácidos y tiene la particularidad de producir mayoritariamente del hidrógeno a través de las vías de acetato y formiato.

EJEMPLO 9: INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE LA CARGA PARA LA BIOMASA DE «FANGOS» EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y EN LA DIVERSIDAD MICROBIANA

Los rendimientos de producción de hidrógeno obtenidos para la biomasa de fangos Pinot Gris de Alsacia (cosechas de 2014) en función de la carga implementada en el biorreactor, de 14 g de DCO/L a 92 g de DCO/L, están representados en la figura 4.

Cuanto más elevada es la carga, más importantes son los volúmenes de hidrógeno producidos y más elevados los valores de productividades obtenidos hasta un contenido de 60 g de DCO/L ($5,20 \pm 0,71$ mmol/L/h para la prueba a 14 g de DCO/L y 18,41 mmol/L/h para la prueba a 60 g de DCO/L). Estos resultados muestran claramente que la biomasa no es solo fuente de materiales fermentables sino también fuente de microorganismos productores de hidrógeno. Para un contenido de 92 g de DCO/L, la productividad obtenida (14,85 mmol/L/h) es inferior a la prueba a 60 g de DCO/L.

Hasta 28 g de DCO/L, el valor de rendimiento de hidrógeno no se ve influido por la carga (1,79 mol/mol obtenidos para «28 g de DCO/L» frente a $1,82 \pm 0,16$ mol/mol para la prueba de «14 g de DCO/L»). Por encima de 28 g de

DCO/L y hasta 60 g de DCO/L, los valores de rendimientos disminuyen ligeramente (1,31 y 1,47 mol/mol, respectivamente para las pruebas de «45 g de DCO/L» y «60 g de DCO/L») y de forma más acusada para un contenido de 92 g de DCO/L (0,77 mol/mol). Así, una carga demasiado elevada en azúcares influye en la producción y la velocidad de producción de hidrógeno bien por la inhibición parcial de ciertas bacterias productoras de hidrógeno o bien por el hecho de que los biocatalizadores han alcanzado su velocidad máxima de conversión de los azúcares en hidrógeno.

El análisis de la estructura microbiana por la clasificación taxonómica en familias de secuencias obtenidas para cada muestra (figura 5) muestra que, entre el phylum *Firmicutes*, phylum mayoritario, *Clostridiaceae* es la familia más abundante a 24 h de fermentación con independencia de la carga con valores de abundancias relativas comprendidos entre el 57,4 % («92 g de DCO/L») y el 86,4 % («28 g de DCO/L»).

Debe observarse que cuanto más elevada es la carga más baja es la abundancia relativa a esta familia. Las otras familias presentes, más minoritarias, son principalmente: *Peptostreptococcaceae* (12,4 %) para la prueba de «14 g de DCO/L»; *Enterobacteriaceae* (5,2 %) para la prueba de «28 g de DCO/L»; *Enterococcaceae* para las pruebas de «60 g de DCO/L» y «92 g de DCO/L» con respectivamente el 5,2 % y el 31,2 % de abundancias relativas. La abundancia relativa de esta última familia parece estar correlacionada con la carga. De hecho, cuanto más aumenta la carga más se incrementa igualmente la abundancia relativa de las *Enterococcaceae*.

En la tabla 11 se presenta la afiliación de las secuencias a la especie o al género microbiano más próximo.

Tabla 11: Afiliación de las secuencias mayoritarias de ADN que codifican ARNr 16S obtenidas por secuenciación a partir de muestras extraídas con 24 h de fermentación durante pruebas de «14 g de DCO/L», «28 g de DCO/L», «60 g de DCO/L» y «92 g de DCO/L».

Especie	Similitud	«14 g DCO/L»	«28 g DCO/L»	«60 g DCO/L»	«92 g DCO/L»
<i>Clostridium</i> spp. (<i>roseum</i> , <i>diolis</i> , <i>beijerinckii</i> , <i>butyricum</i>)	99,5 %	74,4 %	78,1 %	71,6 %	57,4 %
<i>Clostridium</i> spp. (<i>sartagoforme</i> , <i>tertium</i>)	100,0 %	2,3 %	0,1 %	<0,1 %	<0,1 %
<i>Clostridium intestinale</i>	99,7 %	3,0 %	6,3 %	0,3 %	<0,1 %
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	100,0 %	1,2 %	1,9 %	0,1 %	<0,1 %
[<i>Clostridium</i>] <i>bifermantans</i>	100,0 %	12,4 %	1,1 %	0,1 %	1,9 %
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	100,0 %	<0,1 %	<0,1 %	<0,1 %	5,6 %
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100,0 %	2,7 %	2,1 %	0,2 %	<0,1 %
<i>Enterococcus villorum</i>	98,7 %	0,8 %	2,8 %	5,2 %	31,2 %
<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	100,0 %	0,7 %	0,7 %	3,7 %	0,5 %
<i>Enterobacteriaceae</i>	99,7 %	0,1 %	5,2 %	1,2 %	0,5 %

El género dominante afiliado a la OTU mayoritaria es *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) con independencia de la carga con las abundancias relativas similares más elevadas para una carga de hasta 60 g de DCO/L y una abundancia más baja para la prueba de «92 g de DCO/L».

Además, se observa que cuanto más elevada es la carga de biomasa mayor es la abundancia relativa de la especie *Enterococcus villorum* (el 0,8 % a 14 g de DCO/L frente a entre el 31,2 % y el 92 g de DCO/L). Por tanto, parece posible que el descenso en producción de hidrógeno a un contenido de 92 g de DCO/L pueda relacionarse con la inhibición parcial de las bacterias productoras de hidrógeno (*Clostridium* spp.).

Por otra parte, las especies minoritarias afiliadas a cada prueba son: [*Clostridium*] *bifermantans* (12,4 %) para la prueba de «14 g de DCO/L», *Clostridium intestinale* (6,3 %) y *Enterobacteriaceae* (5,2 %) para la prueba de «28 g de DCO/L», *Enterococcus villorum* para la prueba de «60 g de DCO/L» (5,2 %) y *Lactobacillus johnsonii* (31,2 %) para la prueba de «92 g de DCO/L». Tres especies afiliadas a tres OTU minoritarias (< 3,7 %) o muy minoritarias (< 0,1 %) están presentes en todas las pruebas: *Clostridium* spp. (*sartagoforme*, *tertium*), *Clostridium acetobutylicum*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Sporolactobacillus laevolacticus*. Así, la secuenciación permite poner de relieve que cuanto mayor es el contenido de biomasa más elevada es la cantidad inicial de azúcares y más importante la diversidad microbiana.

EJEMPLO 10: INFLUENCIA DEL ESTADO DE CONSERVACIÓN DE LA BIOMASA DE «FANGOS» EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y EN LA DIVERSIDAD MICROBIANA - INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DEL GAS DE BARRIDO QUE PERMITE LA EXTRACCIÓN DE LOS GASES PRODUCIDOS

En este estudio, los rendimientos de producción de hidrógeno (figura 6) de la biomasa de fangos de Alsacia, Pinot

Gris (cosechas de 2014) almacenada a 4 °C («sin ptf») se compara con la de la biomasa almacenada a -20 °C («ptf») y a la biomasa almacenada a -20 °C y que se ha sometido a un pretratamiento térmico a 70 °C (durante 1 h) («ptfc»). En paralelo, se realizó un estudio comparativo sobre el impacto de la naturaleza del gas de barrido en la biomasa almacenada a 20 °C.

Los valores de producción de hidrógeno obtenidas para las pruebas de «sin ptf», «ptf» (media efectuada en las pruebas entre 35 y 115 días de almacenamiento) y «ptf + CO₂» son próximos con, para la prueba en que la biomasa almacenada a -20 °C se sometió a un pretratamiento térmico a 70 °C, el volumen de hidrógeno producido más elevado (3,7 L/L).

Los valores de productividades de hidrógeno obtenidas a partir de diferentes pruebas varían entre 4,16 y 5,64 mmol/L/h. Los valores obtenidos para las pruebas de «ptf» son estadísticamente superiores a las pruebas «sin ptf» y «ptf + CO₂», y solo los 5,64 mmol/L/h obtenidos durante la prueba de «ptf + ptc» son más elevados.

Los valores de rendimientos obtenidos a partir de diferentes pruebas varían entre 1,82 ± 0,16 y 2,45 mol/mol. El valor de rendimiento obtenido para la prueba en que la biomasa congelada se trató previamente térmicamente es el más elevado y el más cercano al rendimiento máximo teórico *in vivo* (61 %).

Además, se puede observar que el uso del CO₂ como gas de barrido no influye en los rendimientos de producción de hidrógeno (rendimiento) comparativamente al uso del nitrógeno y permite plantear el reciclado del dióxido de carbono producido reduciendo así el consumo de gas externo.

El estudio realizado sobre la influencia del tiempo de almacenamiento permitió poner de relieve una evolución de la flora microbiana en función del tiempo de almacenamiento. Por este motivo se eligieron dos pruebas de «ptf 35 días» y «ptf 63 días» como las más próximas en términos de tiempos de almacenamiento, para comparar respectivamente las pruebas «sin pt» (12 días) y «ptf + ptc» (154 días)

La figura 7 representa la clasificación taxonómica en la familia obtenida para las muestras pretratadas o no.

El phylum *Firmicutes* es el más abundante con valores de abundancias relativas que varían entre el 96,0 % y el 97,6 % respectivamente para «35 días» y «ptf + ptc» (figura no representada). *Clostridiaceae* es la familia más abundante con independencia de la prueba con valores de abundancias relativas que varían entre el 80,3 % y el 94,5 %. Al contrario que las pruebas de «ptf 35 días» y «ptf 63 días», las pruebas «sin pt» y «ptf + ptc» están compuestas por familias minoritarias que tienen abundancias relativas inferiores al 3,8 %.

En la tabla 12 se presenta la afiliación de las secuencias a la especie o al género microbiano más próximo para las pruebas «sin pt» y «ptf + ptc».

Tabla 12: Afiliación de las secuencias mayoritarias de ADN que codifican ARNr 16S obtenidas por secuenciación a partir de muestras extraídas con 24 h de fermentación durante pruebas «sin pt» y «ptf + ptc».

	Similitud	sin ptf	ptf 35 días	ptf 63 días	ptf + ptc
<i>Clostridium</i> spp. (<i>roseum</i> , <i>diolis</i> , <i>beijerinckii</i> , <i>butyricum</i>)	99,5 %	34,4 %	35,9 %	74,5 %	67,8 %
<i>Clostridium</i> sp.	98,7 %	3,8 %	23,0 %	0,4 %	1,8 %
<i>Clostridium</i> spp. (<i>sartagoforme</i> , <i>tertium</i>)	100,0 %	1,3 %	1,7 %	2,3 %	20,7 %
<i>Clostridium intestinale</i>	99,7 %	45,6 %	25,2 %	3,0 %	4,1 %
<i>Clostridium perfringens</i>	100,0 %	4,6 %	0,2 %	0,2 %	<0,1 %
[<i>Clostridium</i>] <i>bifermentans</i>	100,0 %	0,6 %	0,2 %	12,4 %	<0,1 %
<i>Anaerosporeobacter mobilis</i>	99,5 %	2,8 %	<0,1 %	<0,1 %	<0,1 %
<i>Enterococcus villorum</i>	98,7 %	3,8 %	9,7 %	0,8 %	0,6 %
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100,0 %	0,1 %	<0,1 %	2,7 %	<0,1 %
<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	100,0 %	0,8 %	0,1 %	0,7 %	2,5 %

Cuando la biomasa no se sometió a tratamiento previo, una especie dominante se afilia a la OTU mayoritaria: *Clostridium intestinale* (45,6 %) mientras que en el estudio anterior en el tiempo de almacenamiento de la biomasa a -20 °C, *Clostridium* spp. (*roseum*, *diolis*, *beijerinckii*, *butyricum*) fue la especie mayoritaria. En el caso de la prueba «sin pt», esta especie es «solo» codominante con el 34,4 % de abundancia relativa. El almacenamiento de la biomasa a -20 °C afecta a la especie *Clostridium intestinale* cuya abundancia relativa disminuyó casi a la mitad para pasar del 45,6 % al 25,2 %, en favor de cepas del género *Clostridium* que cuando la biomasa se almacena a -20 °C durante 35 días pasa del 3,8 % al 23,0 %. *Clostridium perfringens* y *Anaerosporeobacter mobilis* también se ven afectadas por el pretratamiento en frío, y sus abundancias relativas respectivas pasan del 4,6 % al 0,2 %, y del 2,8 %

al < 0,1 %. Por el contrario, *Enterococcus villorum* no se ve influida por el pretratamiento en frío ya que está presente en las dos pruebas (respectivamente del 3,8 % y el 9,7 %). En cuanto al pretratamiento en caliente, afecta negativamente a [*Clostridium*] *bifermentans* y *Leuconostoc mesenteroides*, para las cuales las abundancias relativas pasan respectivamente del 12,4 % a < 0,1 %, y del 2,7 % a < 0,1 %. Por el contrario, el pretratamiento térmico en

EJEMPLO 11: ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE LA BIOMASA DE «ORUJOS DE UVA»

El estudio de la estructura de las comunidades microbianas en muestras extraídas en curso de fermentación (24 h) se realizó para orujos de uva obtenidos de las cosechas de 2013, almacenados a -20 °C, y que provienen de diferentes suelos: Alsacia (variedades Pinot Gris (APG) y Moscatel (AM)) y Borgoña (variedad Chardonnay (tratamiento de cultivo ecofitosanitario (Becofito))), cuyos rendimientos de producción de hidrógeno se recogen en la tabla 3.

En la tabla 13 se muestra la afiliación de las secuencias a la especie o al género microbiano más próximo para estas 3 muestras.

Tabla 13: Afiliación de las secuencias mayoritarias de ADN que codifican ARNr 16S obtenidas por secuenciación a partir de muestras extraídas con 24 h de fermentación para los orujos de uva (cosechas de 2013) de Alsacia, variedad Pinot Gris (APG), variedad Moscatel (AM) y de Borgoña, variedad Chardonnay (tratamiento de cultivo ecofitosanitario) (Becofito).

	Similitud	APG	AM	Becofito
<i>Klebsiella spp. (oxytoca, michiganensis)</i>	99,7 %	98,0 %	99,8 %	98,9 %
<i>Clostridium spp. (roseum, diolis, beijerinckii, butyricum)</i>	99,5 %	0,3 %	<0,1 %	0,4 %
<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	100,0 %	0,3 %	0,0 %	0,0 %
<i>Clostridium spp. (sartagoforme, tertium)</i>	100,0 %	<0,1 %	0,0 %	0,0 %
<i>Methylibium sp.</i>	100,0 %	0,4 %	<0,1 %	0,1 %

Para las 3 muestras de orujos, el phylum *Proteobacteria* es el más abundante con valores de abundancia relativos del 98,4 %, el 99,9 % y el 99,0 % respectivamente para las muestras APG, AM y Becofito. La especie dominante está afiliada a la OTU mayoritaria: *Klebsiella spp. (oxytoca, michiganensis)* (98,0 %, 99,8 % y 98,9 % respectivamente para las muestras APG, AM y Becofito).

Estos resultados muestran que la microflora endógena presente en los orujos en curso de fermentación es diferente de las presentes en la biomasa de fangos para las cuales el phylum *Firmicutes* es el más abundante.

En resumen:

La fermentación según el procedimiento de la invención se realizó en un reactor de 1 L de doble envoltura colocado en la oscuridad y dotado de un sistema de extracción de gases puesto a punto en laboratorio que permite a la vez garantizar las condiciones de anaerobiosis y reducir al mínimo la presión parcial de hidrógeno, siendo este un inhibidor de la actividad microbiana. A modo indicativo para los fangos, el rendimiento medio de hidrógeno obtenido es de $2,0 \pm 0,4$ mol de H_2 /mol de hexosa con un volumen producido comprendido entre 1,9 y 5,3 L de H_2 /L_{reactor} según el acondicionamiento de la biomasa, que corresponde potencialmente a una producción comprendida entre 26,7 y 74,8 L de H_2 /L_{biomasa}. Para los orujos, el rendimiento medio de hidrógeno se eleva a $1,3 \pm 0,2$ mol de H_2 /mol de hexosa y una producción media de $22,4 \pm 4,6$ L de H_2 /kg_{biomasa}. Para los orujos, el rendimiento medio de hidrógeno se eleva a $1,3 \pm 0,2$ mol de H_2 /mol de hexosa y una producción media de $22,4 \pm 4,6$ L de H_2 /kg_{biomasa}.

Los estudios sobre la identificación bacteriana por secuenciación ponen de relieve la presencia de los géneros *Clostridium* y *Enterobacter*.

La reproductibilidad se sometió a ensayo en fangos obtenidos de las cosechas de 2012 y 2013, los perfiles de producción son similares en lotes congelados, los volúmenes de hidrógeno producido y los rendimientos son del mismo orden de magnitud.

Las pruebas de la biomasa de orujos con o sin raspones dan lugar a perfiles de producción muy similares (volumen de hidrógeno producido: 1,55 L (con raspones) y 1,48 L (sin raspones)).

Al estar el consorcio microbiano compuesto principalmente por bacterias de los géneros *Clostridium* o *Enterobacter*, la actividad de la carga microbiana obtenida de la reacción debe tratarse de la misma manera que los digestatos después de la metanización. Por este motivo el procedimiento de fermentación oscura podrá finalmente emplearse por delante de todas las operaciones de extracción de moléculas de interés de la biomasa inicial con el fin de

conservar las propiedades de estas moléculas.

El paso a la escala industrial puede efectuarse con el conocimiento industrial en materia de biodigestor para la metanización. De hecho, los dos procedimientos están próximos tecnológicamente.

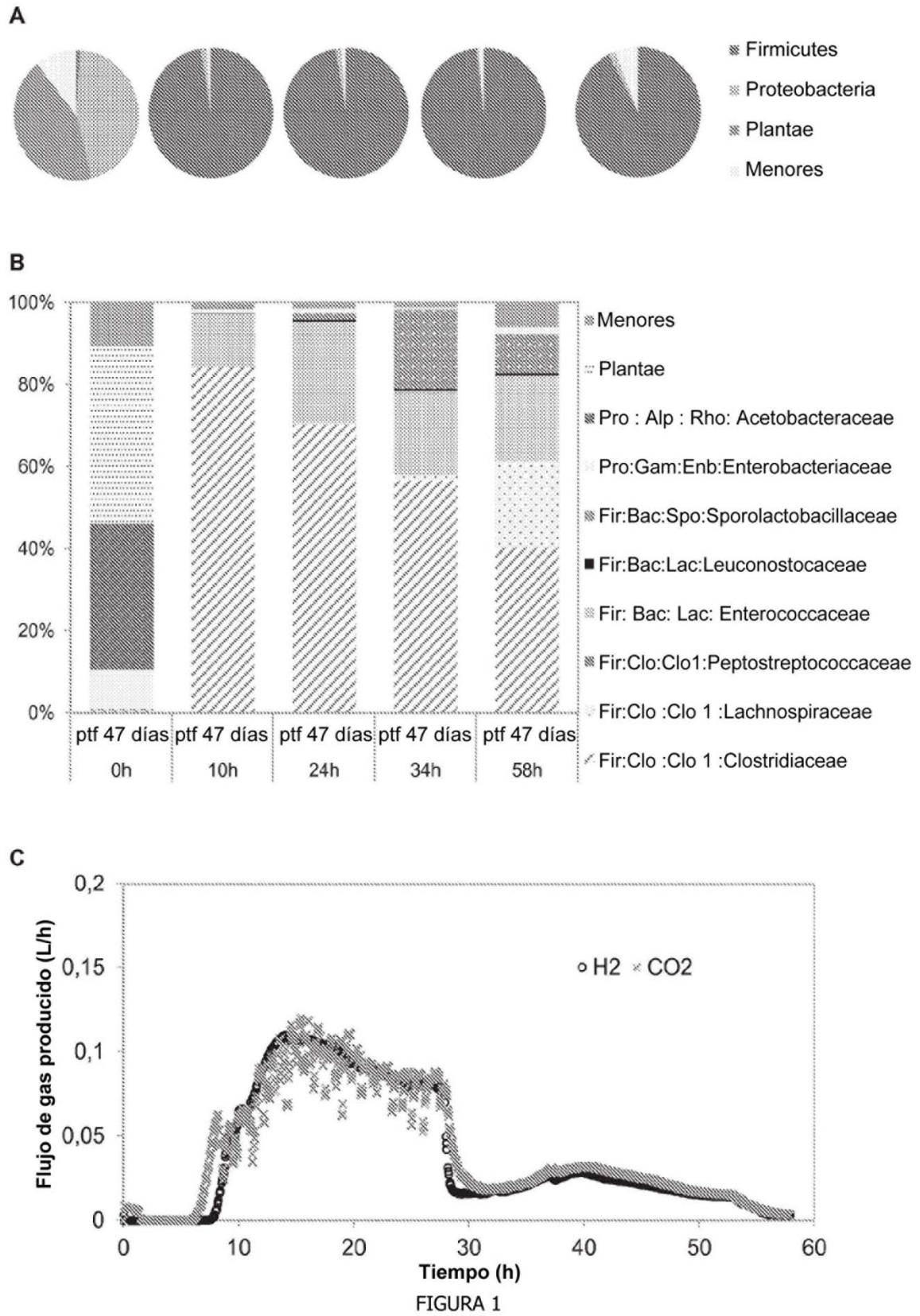
5

Listas de referencias

- [1] Organisation Internationale de la vigne et du vin, Rapport statistique sur la vitiviniculture mondiale, 2013
- [2] Christ et al., Journal of Cleaner Production, 53 : 232-242, 2013
- 10 [3] Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture. FAOSTAT database. , 2013
- [4] Toscano et al., Biomass and Bioenergy, 55 : 260-267, 2013
- [5] Institut Français de la Vigne et du Vin : Expérimentation nationale dur la valorisation des sous-produits vinicoles. Itinéraires 25, 2013
- [6] Muradov et al., International Journal of Hydrogen Energy, 33 : 6804-6839, 2008
- 15 [7] Guo et al., International Journal of Hydrogen Energy, 35 : 10660-10673, 2010
- [8] Hawkes et al., International Journal of Hydrogen Energy, 27 : 1339-1347, 2002
- [9] Thauer et al., Bacteriol. Rev., 41 : 100-180, 1977
- [10] Hawkes et al., International Journal of Hydrogen Energy, 32 : 172-184, 2007
- 20 [11] Rapport au nom de l'Office parlementaire d'évaluation de choix scientifiques et technologiques de MM. Laurent Kalinowski et Jean-Marc Pastor, L'hydrogène : vecteur de la transition énergétique ?, Rapport enregistré à la Présidence de l'Assemblée Nationale sous le n° 1672 et à la Présidence du Sénat sous le n° 253, le 19/12/13
- [12] Hwang et al., Bioresource Technology, 102(2): 1051-1058, 2011
- [13] Doi et al., International Journal of Hydrogen Energy, 35: 7369-7376, 2010

REIVINDICACIONES

- 1.Procedimiento de producción de hidrógeno que comprende la fermentación oscura de biomasa vitivinícola, sin adición de consorcio microbiano y sin pretratamiento térmico, y en el que se extrae el gas producido por dicha fermentación de la biomasa.
5
- 2.Procedimiento según la reivindicación 1, en el que no se aporta ningún aporte nutricional adicional a la biomasa.
- 3.Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la biomasa vitivinícola se elige entre los fangos de uva, orujos de uva, tortas de filtrado, depósitos de vino, orujos agotados, aguas de lavado de los materiales de recolección, selección y vinificación.
10
- 4.Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la biomasa usada está compuesta por una o varias fuentes de biomasa vitivinícolas diferentes.
15
- 5.Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, en el que la biomasa se obtiene de la industria vitivinícola y se refiere a las uvas usadas para la vinificación por prensado de la cosecha, con independencia del suelo, el color de la uva y la variedad.
- 6.Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la biomasa vitivinícola se elige entre los fangos u orujos de uva de Alsacia o de Borgoña, y/o aguas de lavado de los lagares.
20
- 7.Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la uva de Alsacia proviene de variedades de Moscatel, Auxerrois, Pinot gris, Gewurztraminer, Riesling y la uva de Borgoña proviene de variedades de Pinot negro, Chardonnay, Pinot negro/Chardonnay o Aligoté.
25
- 8.Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la fermentación se realiza a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 9.Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la biomasa vitivinícola se conserva por refrigeración o congelación antes del uso.
30
- 10.Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el pH de la biomasa es superior a $5,5 \pm 0,2$ durante la fermentación.
35
- 11.Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el gas producido por la fermentación de la biomasa se extrae mediante un gas de barrido.
- 12.Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además una etapa de aislamiento del consorcio microbiano contenido en la biomasa fermentada o en fermentación.
40
- 13.Procedimiento para obtener el consorcio microbiano presente en la biomasa fermentada según el procedimiento de la reivindicación 12.



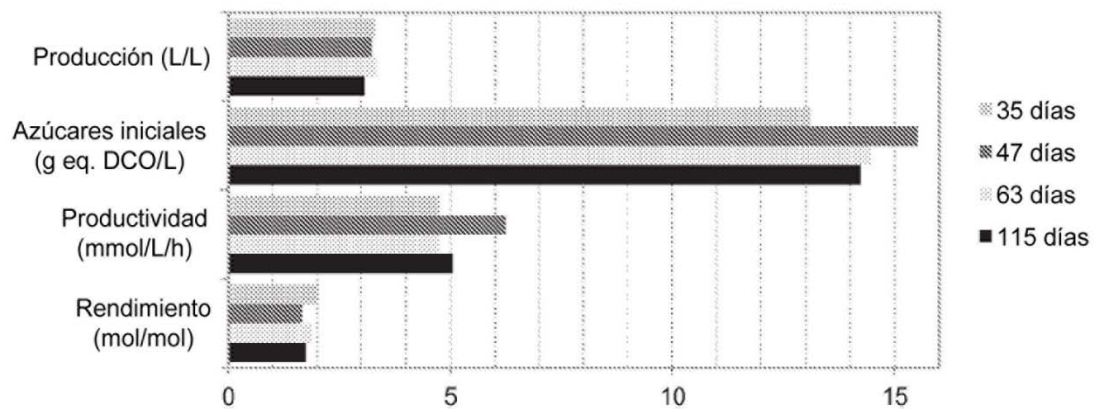


FIGURA 2

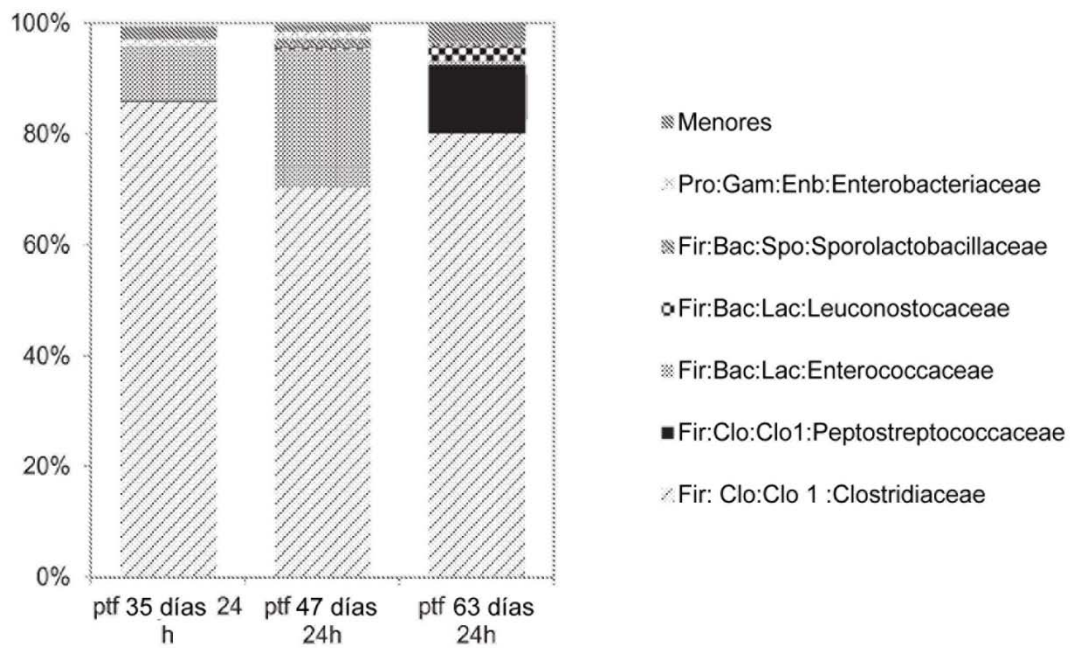


FIGURA 3

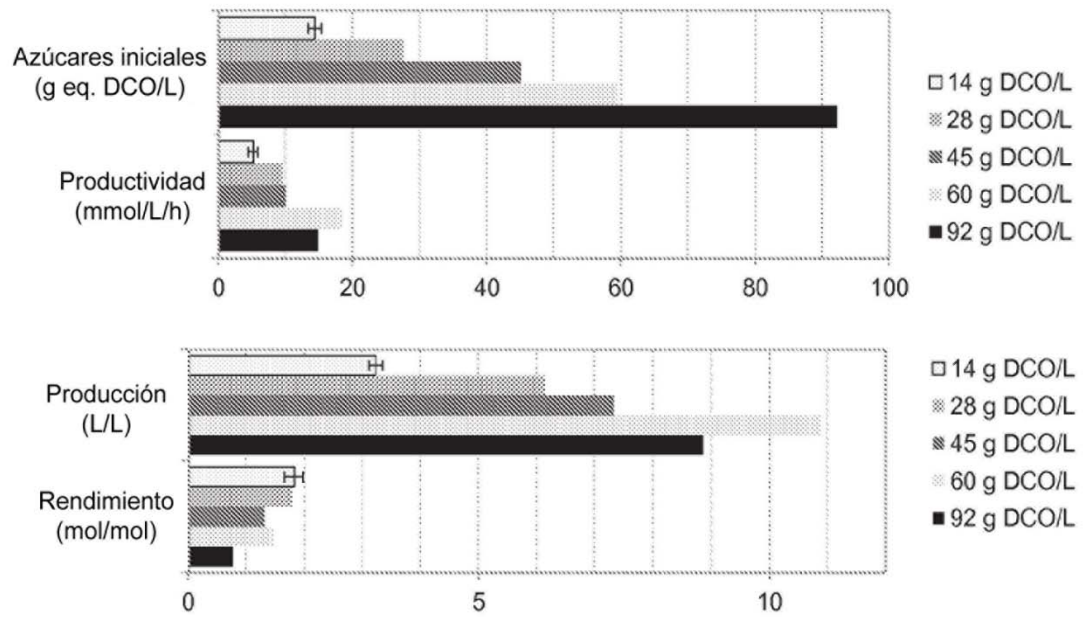


FIGURA 4

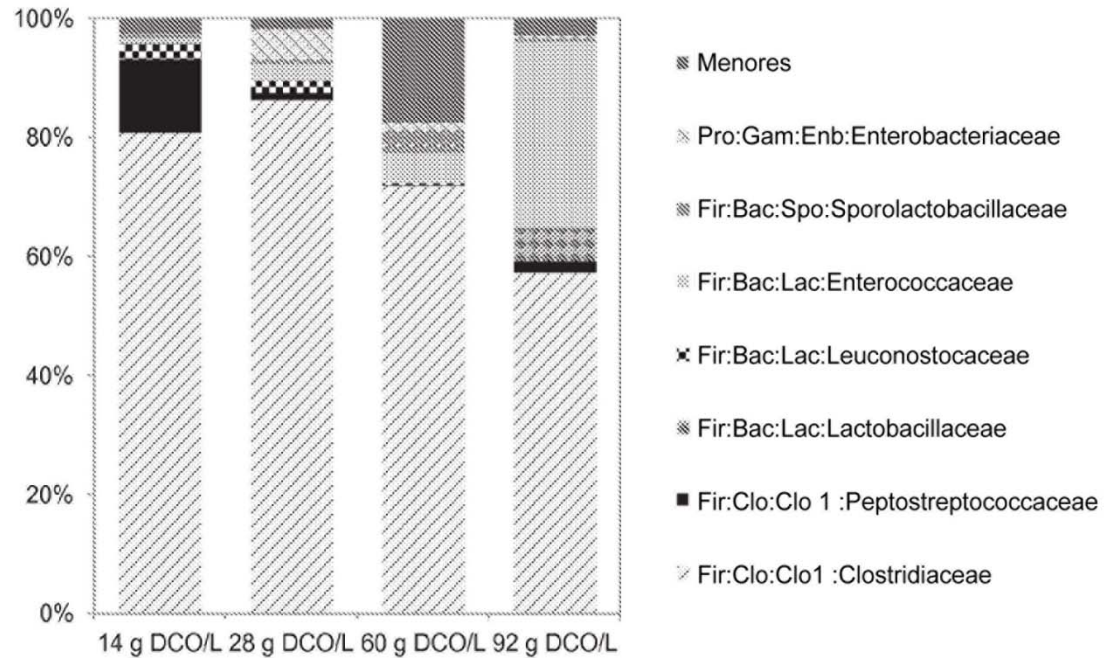


FIGURA 5

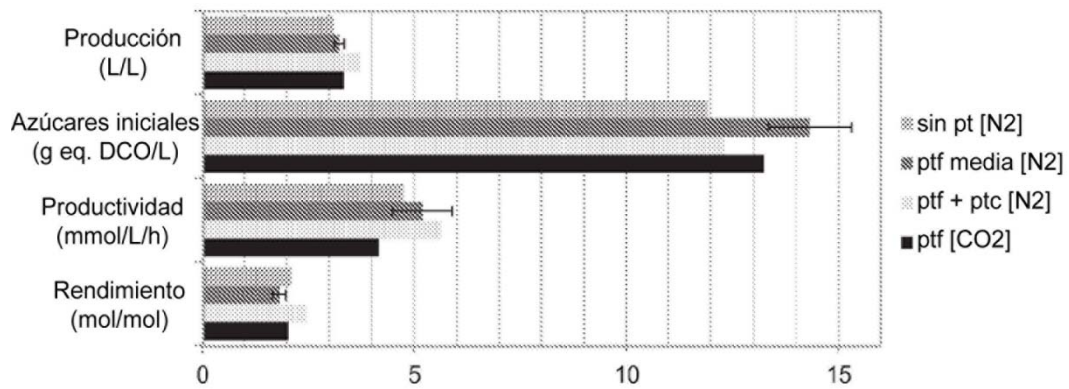


FIGURA 6

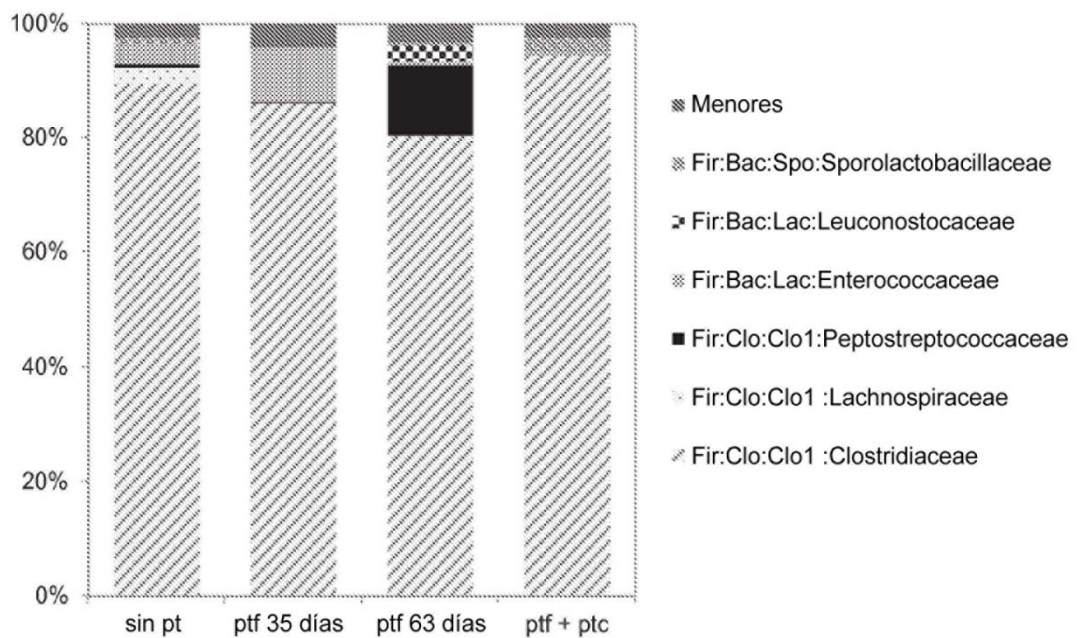


FIGURA 7