

## PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES A PARTIR DE MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR USANDO *Serratia marcescens*

Biofuel production from sugar cane molasses using *Serratia marcescens*

Sergio CISNEROS DE LA CUEVA<sup>1\*</sup>, Cecilia Lizeth ÁLVAREZ GUZMAN<sup>2</sup>, Ivan SALMERÓN<sup>1</sup>, Samuel Bernardo PÉREZ VEGA<sup>1</sup> y Rubén SANTIAGO ADAME<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de Chihuahua, Circuito Universitario Campus II s/n, 31125 Chihuahua, Chihuahua, México.

<sup>2</sup> Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, 76230 Querétaro, Querétaro, México.

<sup>3</sup> Universidad Autónoma de Tamaulipas, Calle 16 y Lago de Chapala s/n, Colonia Aztlán, 88740 Reynosa, Tamaulipas, México.

\*Autor para correspondencia: [sdelacueva@uach.mx](mailto:sdelacueva@uach.mx)

(Recibido; abril de 2023; aceptado: agosto de 2023)

Palabras clave: hidrógeno, fermentación oscura, productos químicos de valor agregado, etanol, 3-metil-1-butanol.

### RESUMEN

En este estudio, diferentes concentraciones de azúcares totales de melaza de caña de azúcar de 0, 15, 30, 45 y 60 g/L fueron evaluadas para la producción de hidrógeno, etanol y 3-metil-1-butanol mediante fermentación oscura de *Serratia marcescens* (MZ413438). Los máximos valores de producción fueron de  $3524.9 \pm 5.1$  mL/L para hidrógeno,  $2611.7 \pm 71$  mg/L para etanol y  $136.9 \pm 0.3$  mg/L para 3-metil-1-butanol, obtenidos para una concentración de 30 g/L. Los datos también nos muestran la sensibilidad de *Serratia marcescens* (MZ413438) a concentraciones de 60 g/L, obteniéndose valores de producción para hidrógeno de  $1249 \pm 29.2$  mL/L, para etanol de  $1603.2 \pm 79.3$  mg/L y para 3-metil-1-butanol de  $100.4 \pm 5.4$  mg/L. Los hallazgos de este estudio incrementan la información sobre la producción de biocombustibles en el marco de un concepto de biorrefinería, y ofrecen bioprocesos alternativos para ser la generación de bioenergía a partir del tratamiento de residuos agroindustriales.

Key words: hydrogen, dark fermentation, value-added chemicals, ethanol, 3-methyl-1-butanol.

### ABSTRACT

In this study, different concentrations of total sugars of sugarcane molasses of 0, 15, 30, 45, and 60 g/L were evaluated for the production of hydrogen, ethanol, and 3-methyl-1-butanol by *Serratia marcescens* (MZ413438) in dark fermentation. The maximum values of production were  $3524.9 \pm 5.1$  mL/L for hydrogen,  $2611.7 \pm 71$  mg/L for ethanol, and  $136.9 \pm 0.3$  mg/L for 3-methyl-1-butanol obtained for 30 g/L concentrations. The data also show the susceptibility of *Serratia marcescens* (MZ413438) to concentrations of 60 g/L, obtaining hydrogen production values of  $1249 \pm 29.2$  mL/L, ethanol of  $1603.2 \pm 79.3$  mg/L, and 3-methyl-1-butanol of  $100.4 \pm 5.4$  mg/L. The findings in this study increase the information on the production of biofuels within the framework of a biorefinery concept and offer alternative bioprocesses to be used for the generation of bioenergy from the treatment of agro-industrial waste.

## INTRODUCCIÓN

La emisión de gases por la combustión de combustibles fósiles es una de las principales causas del calentamiento global del planeta, y sus efectos han tenido consecuencias negativas para el medio ambiente, la economía y la salud de las personas (Miyat et al. 2020). Los biocombustibles gaseosos y líquidos son una alternativa prometedora para reemplazar a los combustibles fósiles, ya que pueden producirse a partir de la materia orgánica contenida en residuos urbanos e industriales (Álvarez et al. 2020, Huerta et al. 2022).

Entre las diferentes tecnologías biológicas utilizadas para la producción de biocombustibles, la fermentación oscura es un enfoque prometedor a futuro, ya que no requiere energía luminosa y se puede utilizar con una amplia variedad de materias primas renovables. Sin embargo, la viabilidad económica de este proceso sigue siendo una faceta vital a considerar (Toledo et al. 2020).

La melaza de caña de azúcar es el subproducto más importante del proceso de cristalización en la producción de azúcar. Datos reportados por la organización internacional del azúcar indican que de 100 t de caña de azúcar se obtienen entre 10-11 t de azúcar y 3-4 t de melaza (ISO 2022). En México, la producción de melaza de caña de azúcar en 2015-2016 fue de 1 975 715 t, con una tasa de crecimiento de 10.5 % a partir de 2006-2007 (CONADESUCA 2016). En este contexto, la mala disposición de este subproducto en suelos y cuerpos de agua puede causar graves problemas ambientales por sus altas concentraciones de materia orgánica, sales y bajo pH. Sin embargo, su adecuado procesamiento puede mejorar la economía de las biorrefinerías, ya que se puede utilizar como sustrato para la producción de biocombustibles y productos químicos de alto valor agregado (de Vrieze et al. 2014).

Se sabe que varios microorganismos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae producen hidrógeno, alcoholes y productos químicos de interés industrial a partir de la fermentación de azúcares (Bai et al. 2015). Se ha identificado que la bacteria *Serratia* tiene la capacidad metabólica de biosintetizar alcoholes, a partir de azúcares reductores como la glucosa (Santos et al. 2020). Un aspecto relevante del uso de *Serratia* en carbohidratos, es su corto tiempo de duplicación celular, de aproximadamente 2.7 h. Por tanto, su uso en los procesos de producción de bioenergía la hace muy atractiva, ya que el tiempo de operación del reactor sería corto y los costos de operación se reducirían significativamente (Salokhe

y Govindwar 1999). Sin embargo, poco se sabe sobre la producción de biocombustibles a partir de los carbohidratos presentes en la melaza de caña de azúcar. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de producción de biocombustibles como hidrógeno, etanol y 3-metil-1-butanol utilizando *Serratia marcescens* (MZ413438) mediante fermentación oscura de la melaza de caña de azúcar a diferentes concentraciones.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Condiciones de crecimiento

En este estudio, *Serratia marcescens* (MZ413438) se tomó de la colección de cultivos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, México. La bacteria se cultivó en medio Luria-Bertani (LB) con la siguiente composición (g/L): 10 de peptona, 5 de extracto de levadura, 5 de NaCl y 15 de agar-agar. Los medios de cultivo se incubaron a 37 °C por 24-48 h (Almuharef et al. 2019).

### Sustrato

El sustrato utilizado fue melaza de caña de azúcar obtenida de la industria local de Gómez Palacio, Durango, México. Las principales características de la melaza de caña de azúcar fueron pH de 5.7, concentración de azúcares totales de 0.6 g/g<sub>melaza</sub>, nitrógeno total Kjeldahl de 2.4E<sup>-2</sup> g/g<sub>melaza</sub>, y sólidos volátiles de 9E<sup>-3</sup> g/g<sub>melaza</sub>.

### Diseño y montaje experimental para la producción de hidrógeno, etanol y 3-metil-1-butanol

Las diferentes concentraciones de carbohidratos totales de la melaza de caña de azúcar evaluadas en el proceso de fermentación oscura con la bacteria *Serratia marcescens* (MZ413438) fueron de 0, 15, 30, 45 y 60 g/L, con un diseño experimental factorial de 1<sup>5</sup> construido con el programa Design-Expert v. 7.0. La designación de los tratamientos respecto de la concentración de carbohidratos totales de melaza de caña de azúcar se muestra en el **cuadro I**. El tratamiento blanco (TB) contenía medio mineral con 30 g/L de carbohidratos de melaza de caña de azúcar sin la adición de la bacteria *Serratia marcescens* (MZ413438). Este tratamiento fue establecido para determinar los factores abióticos que pudieran afectar el periodo de fermentación oscura.

El proceso de fermentación oscura se realizó en botellas de vidrio estériles de 50 mL de capacidad con un volumen de trabajo de 40 mL. Cada botella se cargó con melaza de caña de azúcar a diferentes

**CUADRO I.** PARÁMETROS CINÉTICOS DE PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y CRECIMIENTO DE *Serratia marcescens* (MZ413438) CALCULADO POR LOS MODELOS LOGÍSTICO MODIFICADO Y AIBA-EDWARD. LOS VALORES REPORTADOS SON LA MEDIA CON SU DESVIACIÓN ESTÁNDAR (n = 2).

Tratamiento	Azúcares totales (g/L)	Modelo logístico modificado			Modelo Aiba-Edward		
		$H_{max}$ (mL/L)	$R_{max}$ (mL/L/h)	$\lambda$ (h)	$\mu_{max}$ (1/h)	$K_s$ (g/L)	$K_i$ (g/L)
TB (Blanco)	30	-	-	-	-	-	-
T0	0	117 ± 12.7 <sup>e</sup>	82 ± 2.2 <sup>a</sup>	6.4 ± 0.2 <sup>d</sup>	-	-	-
T1	15	3048.4 ± 75.4 <sup>b</sup>	79.3 ± 1 <sup>a</sup>	11.9 ± 3E <sup>-4c</sup>	8.8E <sup>-2</sup> ± 7.7E <sup>-3a</sup>	3.6 ± 2.4E <sup>-2b</sup>	3 ± 0.1 <sup>b</sup>
T2	30	3524.9 ± 5.1 <sup>a</sup>	69.7 ± 0.6 <sup>b</sup>	12.5 ± 0.5 <sup>b,c</sup>	5.3E <sup>-2</sup> ± 3.9E <sup>-4b</sup>	3.7 ± 6.8E <sup>-2b</sup>	6.9 ± 1.1E <sup>-1a</sup>
T3	45	2506.6 ± 44.5 <sup>c</sup>	61.1 ± 1.1 <sup>c</sup>	13.2 ± 0.4 <sup>b</sup>	5.1E <sup>-2</sup> ± 1.8E <sup>-3b</sup>	3.8 ± 0.1 <sup>a,b</sup>	6.9 ± 6.9E <sup>-2a</sup>
T4	60	1249 ± 29.2 <sup>d</sup>	33.5 ± 3 <sup>d</sup>	14.9 ± 3E <sup>-2a</sup>	5.3E <sup>-2</sup> ± 1.3E <sup>-3b</sup>	4.1 ± 9.9E <sup>-2a</sup>	6.9 ± 2.7E <sup>-3a</sup>

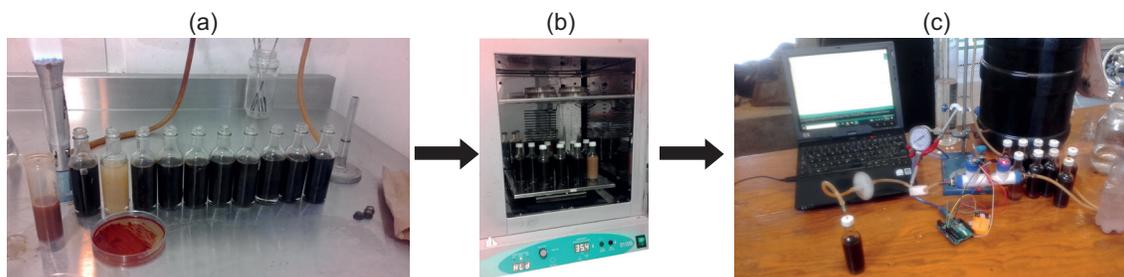
$H_{max}$ : potencial de producción de hidrógeno;  $R_{max}$ : máxima velocidad de producción de hidrógeno;  $\lambda$ : tiempo de la fase lag;  $\mu_{max}$ : máxima velocidad específica de crecimiento;  $K_s$ : constante de saturación media de sustrato;  $K_i$ : constante de inhibición. Las letras a hasta e en negritas colocadas como superíndices para cada valor medio indican la diferencia estadísticamente significativa de los diferentes tratamientos. Los valores medios que no comparten una letra son estadísticamente diferentes.

concentraciones de acuerdo con el diseño experimental y con medio mineral modificado descrito originalmente por Kumar et al. (2019) con la siguiente composición (g/L): 15 de NaHCO<sub>3</sub>, 5 de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 de (NH<sub>4</sub>)<sub>5</sub>[Fe(C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>]·2H<sub>2</sub>O, 1 de MgSO<sub>4</sub>, 0.05 de CaCl<sub>2</sub>, 0.5 de extracto de levadura y 1 mL de solución de oligoelementos. La solución de oligoelementos estuvo compuesta por (g/L): 5 de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 de MnSO<sub>4</sub>, 1 de CoCl<sub>2</sub> y 1 de ZnCl<sub>2</sub>. En cada botella el pH del medio se ajustó a 7.5 y se inoculó con un cultivo de la bacteria *Serratia marcescens* (MZ413438) al 5 % v/v por volumen de trabajo cuya densidad óptica a 600 nm era de 2.0. Después de la inoculación, cada botella se cubrió con un tapón de goma de butilo y se purgó con gas nitrógeno puro para generar las condiciones anaeróbicas (Fig. 1a). Las botellas se incubaron a 35 °C y se agitaron a 120 rpm (Fig. 1b). Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

**Procedimientos analíticos**

El perfil de crecimiento de *Serratia marcescens* (MZ413438) en los diferentes tratamientos se determinó según el método de recuento en placa de agar, y los conteos celulares se transformaron a logaritmo base 10, expresando el resultado como log de unidades formadoras de colonia (UFC) por mL (Fujikawa et al. 2004).

El volumen de gas hidrógeno producido en las botellas se midió por el método de desplazamiento de volumen de bureta invertida (Cisneros et al. 2021). La bureta contenía una solución de NaOH 1N, lo que permitió que el CO<sub>2</sub> y otros gases quedaran atrapados en la solución, pudiéndose cuantificar de esta manera la producción de hidrógeno. La presencia de gas hidrógeno se confirmó utilizando un sensor Arduino MQ-8 conectado a la bureta (Fig. 1c). A partir de la ley combinada de los gases (ecuación 1) se normalizó el volumen de hidrógeno cuantificado.



**Fig. 1.** (a) Montaje experimental del proceso de fermentación oscura en botellas de vidrio de 50 mL de capacidad. (b) Incubación de las botellas a 120 rpm y 35 °C. (c) Toma de muestra y cuantificación del hidrógeno producido en cada botella durante el proceso de fermentación.

$$v_2 = \frac{P_1 v_1 T_2}{T_1 P_2} \quad (1)$$

donde  $v_2$  es el volumen final de hidrógeno (mL),  $v_1$  es el volumen de hidrógeno recogido en la bureta (mL),  $T_1$  es la temperatura a la que se realizó el experimento de 298 K,  $T_2$  es la temperatura en condiciones estándar (273 K),  $P_1$  es la presión barométrica (762.7-769.6 mmHg) menos la presión de vapor de la solución de hidróxido de sodio (24.2 mmHg) y  $P_2$  es la presión en condiciones estándar (760 mmHg). El volumen de hidrógeno calculado se dividió por el volumen de trabajo de cada experimento (40 mL), expresando la producción de hidrógeno en mL/L.

La medición del pH se realizó utilizando un electrodo HI 1131B conectado a un medidor de pH HANNA Instruments. La determinación de nitrógeno total Kjeldahl y sólidos suspendidos volátiles contenidos en la melaza de caña de azúcar, se realizaron de acuerdo con los métodos de la APHA-AWWA-WPCF (2017). La concentración de azúcares totales de la melaza de caña de azúcar se determinó utilizando el método colorimétrico de DuBois (DuBois et al. 1956). Los ácidos grasos volátiles (AGV) se determinaron utilizando la metodología descrita por de Godoi et al. (2017).

El etanol y el 3-metil-1-butanol se detectaron y cuantificaron al final del periodo experimental utilizando la técnica de espacio de cabeza en un equipo de cromatografía de gases modelo 7890B (Agilent Technologies, USA) acoplado a un detector de masas 5975 C (Agilent Technologies, USA). Para la separación de los compuestos en el cromatógrafo de gases se utilizó una columna capilar HP-INNOWAX ms (30 m × 0.25 mm DI; espesor de película de 1.0 μm [Agilent, EUA]). La rampa de temperatura usada en el cromatógrafo de gases fue programada en el siguiente orden: temperatura inicial a 50 °C durante 5 min, aumento a 80 °C durante 10 min, aumento a 100 °C durante 10 min, aumento a 180 °C durante 5 min y finalmente aumento a 200 °C durante 5 min. Se utilizó helio como gas portador a un caudal de 1 ml/min. El cuadrupolo de masas para la detección por espectrometría de masas se hizo funcionar a 180 °C en el modo de impacto de electrones (EI 70 eV). La temperatura de la fuente de iones se fijó en 220 °C y la línea de transferencia en 210 °C. El rango de adquisición de masas fue de 40-400 m/z. Los picos se identificaron en función de sus patrones de fragmentación utilizando el programa de búsqueda espectral de masas NIST versión 2.0.

### Estimación de parámetros cinéticos de producción de hidrógeno y crecimiento microbiano

Los parámetros cinéticos de producción de hidrógeno se determinaron utilizando el modelo logístico modificado que se muestra en la ecuación 2 (Wang y Wan 2009).

$$H = \frac{H_{max}}{1 + \exp\left[\frac{4R_{max}(\lambda - t)}{H_{max} + 2}\right]} \quad (2)$$

donde  $H$  es la producción acumulada de hidrógeno (mL/L),  $R_{max}$  es la máxima velocidad de producción de hidrógeno (mL/L/h),  $H_{max}$  es el potencial de producción de hidrógeno (mL/L),  $\lambda$  es el tiempo de fase lag (h) y  $t$  es el tiempo de incubación (h)

Los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano se determinaron utilizando el modelo Aiba-Edwards que se muestra en la ecuación 3 (Muloiwa et al. 2020).

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \exp\left(-\frac{S}{K_i}\right) \quad (3)$$

donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento (1/h),  $\mu_{max}$  es la máxima velocidad específica de crecimiento (1/h),  $S$  es la concentración de sustrato (g/L),  $K_s$  es la constante de saturación media de sustrato (g/L) y  $K_i$  es la constante de inhibición (g/L).

Se utilizó la herramienta Solver de Excel v. 2018 para estimar los valores de los parámetros cinéticos de ambos modelos por mínimos cuadrados no lineales utilizando el método de Levenberg-Marquardt.

### Análisis de datos

Los datos obtenidos de la producción de etanol, 3-metil-1-butanol y los parámetros cinéticos de producción de hidrógeno y crecimiento microbiano fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza por la prueba de comparación de medias de Tukey. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Minitab v. 16.1.0. Para identificar el metabolismo realizado por *Serratia marcescens* (MZ413438) para la producción de hidrógeno, etanol y 3-metil-1-butanol se revisaron las bases de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por su sigla en inglés) (NCBI 2022) y la enciclopedia de Kyoto de Genes y Genomas (KEGG, por su sigla en inglés) (KEGG 2022).

El análisis filogenético se realizó utilizando secuencias de nucleótidos del gen 16S rARN del NCBI (NCBI 2022) de bacterias reportadas como productoras de biocombustibles.

A partir de las secuencias obtenidas del NCBI, la construcción del árbol filogenético se llevó a cabo por el método de unión de vecinos y máxima verosimilitud con 100 réplicas utilizando el programa MEGA v. 11 (Hall 2013).

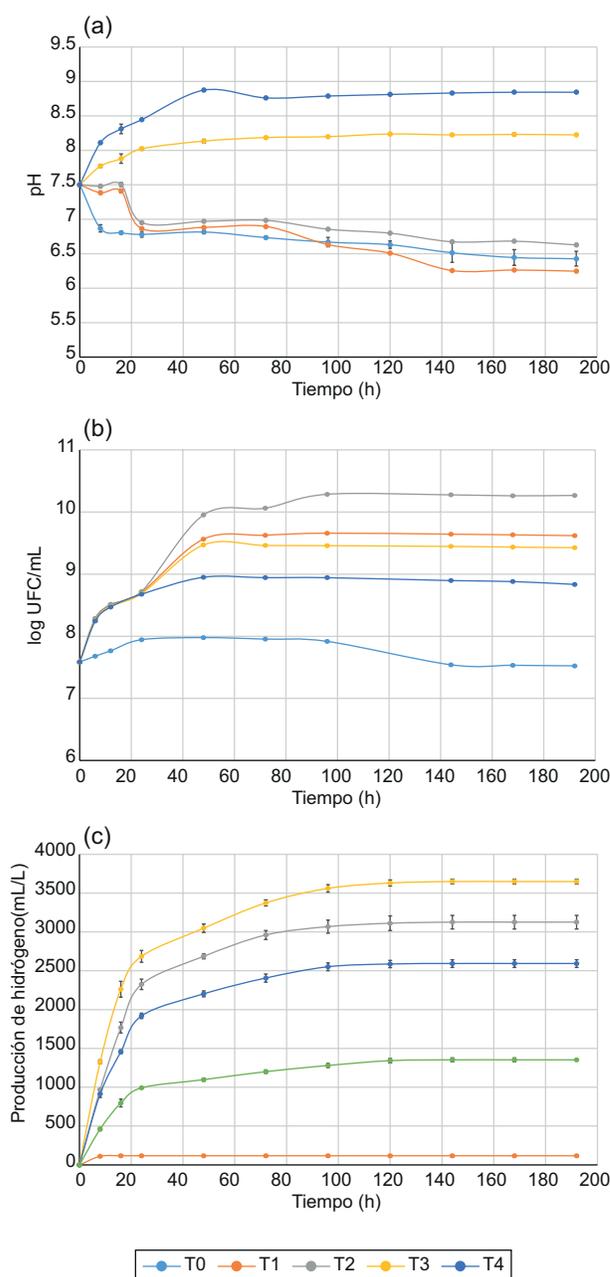
## RESULTADOS

### pH y crecimiento celular

Inicialmente, el pH de los cultivos fue ajustado a 7.5 y fue monitoreado a lo largo del proceso de fermentación con el fin de conocer el efecto de las diferentes condiciones de cada tratamiento. En la **figura 2a** se muestran los cambios en los valores de pH a lo largo del proceso de fermentación de la melaza de caña de azúcar de los diferentes tratamientos. En los tratamientos T0, T1 y T2 los valores de pH disminuyeron conforme transcurría el proceso de fermentación, obteniéndose valores finales de 6.4, 6.2 y 6.6, respectivamente. Por otro lado, los valores de pH en los tratamientos T3 y T4 se incrementaron, obteniéndose valores finales de 8.2 y 8.8, respectivamente.

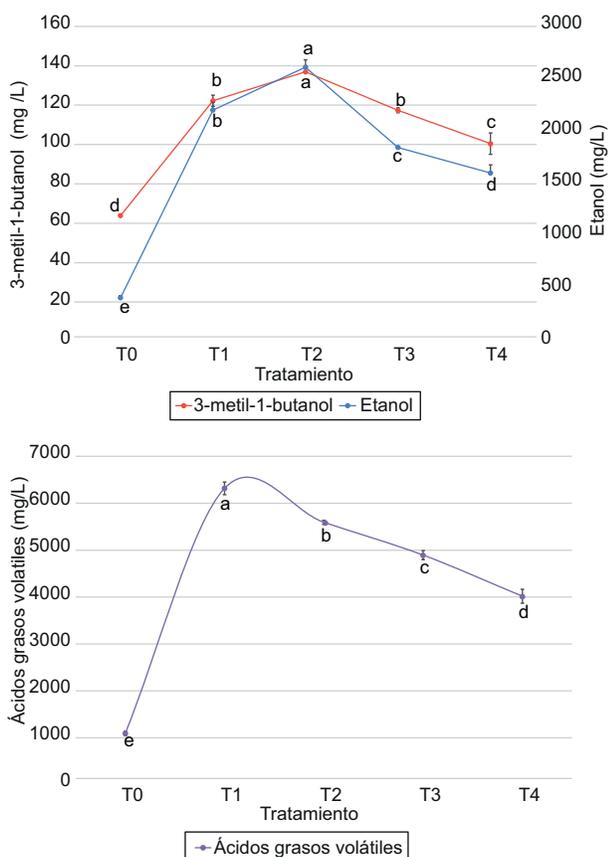
Los valores de pH obtenidos en los diferentes tratamientos se pueden atribuir a la formación de productos metabólicos, como ácidos orgánicos producidos por *Serratia marcescens* (MZ413438) durante la fermentación. En la **figura 3b** se muestra que los valores de concentración de los AGV obtenidos en los diferentes tratamientos al final de la fermentación se correlacionan con los valores de pH. En el tratamiento T1 se obtuvieron valores de AGV de  $6315.9 \pm 136.3$  mg/L, que fueron más altos en comparación con los tratamientos T2, T3 y T4, lo cual obedece a que se hayan obtenido valores de pH final de 6.8. Por otro lado, en el tratamiento T4 se obtuvieron valores de AGV de  $4017.2 \pm 44.2$  mg/L, que fueron más bajos en comparación con los tratamientos T1, T2 y T3, presentando valores de pH final de 8.3. En el tratamiento T0 se obtuvieron los valores más bajos de AGV de  $1092.5 \pm 46.3$  mg/L; sin embargo, los valores finales de pH fueron de 6.5. Este comportamiento se puede atribuir a que, como reportaron Salmerón et al. (2022) en un estudio previo, *Serratia marcescens* (MZ413438) puede consumir el bicarbonato como fuente de carbono para producir ácidos orgánicos, reduciendo la capacidad buffer del medio.

En la **figura 2b** se muestra que en el crecimiento de *Serratia marcescens* (MZ413438) para los tratamientos T1 a T4 presentó una fase exponencial de 0 a 48 h y otra fase estacionaria de 48 a 192 h. Por



**Fig. 2.** Comportamiento cinético de *Serratia marcescens* (MZ413438) en los diferentes tratamientos para (a) pH, (b) crecimiento celular y (c) producción de hidrógeno. Los valores reportados son la media con su desviación estándar (n = 2).

otro lado, en el tratamiento T0 la fase exponencial se presentó de 0 a 24 h seguida de una fase estacionaria de 24 a 96 h. Los valores más bajos de crecimiento fueron obtenidos para el tratamiento T0, mientras que los valores más altos para el tratamiento T2.



**Fig. 3.** Valores de producción de (a) etanol y 3-metil-1-butanol y (b) ácidos grasos volátiles obtenidos para los tratamientos con diferente concentración de carbohidratos de melaza de caña de azúcar. Las diferentes letras del alfabeto a un lado del marcador indican la diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos. Los valores reportados son la media con su desviación estándar ( $n = 2$ ).

En el **cuadro I** se muestran los valores de los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano obtenidos por el modelo Aiba-Edward en los que se incluyen  $\mu_{max}$ ,  $K_s$  y  $K_i$ . Los valores de  $\mu_{max}$  indican la máxima velocidad específica de crecimiento de *Serratia marcescens* (MZ413438) en los diferentes tratamientos. Bajos valores de  $\mu_{max}$  muestran que *Serratia marcescens* (MZ413438) tuvo un lento crecimiento y viceversa.  $K_s$  es la constante de saturación de sustrato, por lo que bajos valores indican una mayor afinidad del microorganismo por el sustrato.  $K_i$  es la constante de inhibición por productos formados, por lo que bajos valores indican un menor efecto inhibitorio (Muloiwa et al. 2020).

Los valores de ajuste de  $R^2$  se obtuvieron en un rango de 0.9-0.98 para los tratamientos T1 a T4, mostrando el buen ajuste del modelo a los datos experimentales.

Los valores estimados de  $\mu_{max}$  mostraron una tendencia a disminuir con el incremento en la concentración de melaza. De este modo, en las condiciones del tratamiento T1 se obtuvieron los valores más altos de  $\mu_{max}$  en comparación con los tratamientos T2, T3 y T4 (**Cuadro I**).

La estimación de los valores tanto de  $K_s$  como  $K_i$  muestran su incremento con el aumento en la concentración de melaza, obteniéndose los valores más altos de  $K_s$  de  $4.1 \pm 9.9E^{-2}$  g/L y  $K_i$  de  $6.9 \pm 2.7E^{-3}$  g/L en el tratamiento T4. Esto indica que en el tratamiento T4, *Serratia marcescens* (MZ413438) tuvo el mayor efecto inhibitorio a la formación de productos y una menor afinidad por la melaza (**Cuadro I**).

Por otro lado, en el tratamiento T1 se obtuvieron valores de  $K_s$  y  $K_i$  de  $3.6 \pm 2.4$  g/L y  $3 \pm 0.1$  g/L, respectivamente, por lo que se tuvo una mayor afinidad por la melaza y menor efecto inhibitorio a la formación de productos.

### Producción de hidrógeno

En la **figura 2C** se muestran los perfiles cinéticos de producción acumulativa de hidrógeno a partir de los diferentes tratamientos. Durante las primeras 48 h de fermentación se obtuvo la mayor producción del gas, mientras que de las 72 a las 192 h la producción descendió drásticamente, observándose un comportamiento lineal.

Los valores obtenidos de  $H_{max}$ ,  $R_{max}$  y  $\lambda$  se determinaron mediante el modelo logístico modificado (**Cuadro I**). El coeficiente  $R^2$  obtenido en los diferentes tratamientos fue en promedio de 0.98, lo que indica la validez y buen ajuste del modelo sobre los datos experimentales.

Los valores de  $H_{max}$  obtenidos en los tratamientos T0 a T4 variaron de 117 a 3524 mL/L. En el tratamiento T0 los valores de producción de hidrógeno fueron de  $117 \pm 12.7$  mL/L, significativamente menores en comparación con los tratamientos T1 a T4, en tanto que en el tratamiento T2 se obtuvieron los valores más altos de producción de hidrógeno, que fueron de  $3524.9 \pm 5.1$  mL/L.

En cuanto a los valores de  $R_{max}$ , estos disminuyeron con el incremento de la concentración de azúcares totales de la melaza de caña de azúcar, obteniéndose en el tratamiento T4 los valores más bajos, que fueron de  $33.5 \pm 3$  mL/L/h. Por otro lado, los valores de  $R_{max}$  obtenidos para el tratamiento T0 de  $82 \pm 2.2$  mL/L/h fueron significativamente mayores en comparación con los tratamientos T1 a T4 (**Cuadro I**). Los valores de  $R_{max}$  se correlacionaron inversamente con los valores de  $\lambda$ , debido a que los tratamientos en que se obtuvieron valores bajos de

$\lambda$  presentaron valores altos de  $R_{max}$  y viceversa. De acuerdo con los valores obtenidos de  $\lambda$ , en el tratamiento T0 se obtuvieron valores de  $6.4 \pm 0.2$  h que fueron significativamente menores en comparación con los tratamientos T1 a T4, mientras que en el tratamiento T4 se obtuvieron valores de  $\lambda$  de  $14.9 \pm 3E^{-2}$  h, significativamente más altos que los tratamientos T0 a T3. Estos resultados indican que a medida que se incrementa la concentración de melaza, la fase lag se prolonga. Este comportamiento puede atribuirse a que se afectó el crecimiento celular de *Serratia marcescens* (MZ413438), lo cual tuvo efecto negativo sobre la producción de hidrógeno (**Fig. 2b**).

En el tratamiento TB no se detectó la presencia de hidrógeno, por lo que la producción de este gas en los tratamientos T0 a T4 no es atribuible a factores abióticos.

### Producción de etanol y 3-metil-1-butanol

Dentro de un concepto de biorrefinería, en este estudio se detectó y cuantificó la producción de etanol y 3-metil-1-butanol, además de la producción de hidrógeno. En la **figura 3** se muestra la producción de ambos alcoholes a las 192 h para los diferentes tratamientos.

Los resultados indican que en el tratamiento T0 el etanol se produjo en una concentración de  $415.8 \pm 19.3$  mg/L, significativamente más bajo en comparación con los tratamientos T1 a T4 (**Fig. 3**). Por otro lado, en el tratamiento T2 los valores de concentración de etanol de  $2611.7 \pm 71$  mg/L fueron significativamente más altos en comparación con el resto de los tratamientos (**Fig. 3**).

En cuanto al otro alcohol cuantificado, el 3-metil-1-butanol, en el tratamiento T0 se obtuvieron valores de concentración de  $63.9 \pm 0.5$  mg/L, significativamente más bajos en comparación con los demás tratamientos. Los máximos valores de concentración del 3-metil-1-butanol de  $136.9 \pm 0.3$  mg/L fueron obtenidos en el tratamiento T2. En los tratamientos T1 y T3, se obtuvieron valores de concentración  $122.2 \pm 2.9$  mg/L y  $117.4 \pm 1.2$  mg/L, respectivamente, significativamente mayores que con el tratamiento T4. Los resultados indican que las condiciones del tratamiento T2 favorecieron la producción de ambos alcoholes.

## DISCUSIÓN

El árbol filogenético construido por el método de unión de vecinos y máxima verosimilitud que se presenta en la **figura 4** muestra que *Serratia marcescens*

(MZ413438) tiene una alta similitud con bacterias que tienen la capacidad producir hidrógeno y una gran diversidad de metabolitos de interés energético e industrial a partir de carbohidratos (Hung et al. 2011). Esto explica en parte la capacidad metabólica de *Serratia marcescens* (MZ413438) para degradar sustratos complejos y producir hidrógeno y alcoholes.

El hidrógeno es considerado un portador de energía muy versátil, ya que se puede utilizar en pilas de combustible para generar la electricidad necesaria para poner en funcionamiento motores de vehículos sin emisiones de CO<sub>2</sub> (Ogden 2002, Corbo et al. 2011). Este biocombustible gaseoso fue producido en todos los tratamientos, donde el pH desempeña un papel esencial en el proceso de fermentación oscura para su producción.

Los datos nos muestran que los valores de pH en un rango de 6.4-6.9, obtenidos en los tratamientos T1 y T2, favoreció notablemente la producción de hidrógeno (**Fig. 2b, c**). Valores de pH de 7.0 han sido reportados por Tunçay et al. (2017) como óptimos para la producción de hidrógeno, utilizando sacarosa y melaza de caña de azúcar. En los tratamientos T3 y T4 se obtuvieron valores de pH por arriba de 8.0 que afectaron la producción de hidrógeno por *Serratia marcescens* (MZ413438), lo cual puede atribuirse a que estos valores pudieron afectar las reacciones intracelulares y extracelulares del metabolismo de la bacteria (Penniston y Gueguim 2018). Se ha reportado que, a pH alcalino, las bacterias dependen para sobrevivir de mecanismos de homeostasis del pH citoplasmático, en que los protones H<sup>+</sup> se acoplan con la ATP sintasa para generar ATP y mantener el pH intracelular en un rango de 7.4 a 7.8, lo cual lleva a una disminución en la producción de hidrógeno (Padan et al. 2005). En otros estudios se ha reportado que cambios mínimos en el pH del biorreactor pueden afectar significativamente el equilibrio microbiano y la producción de metabolitos (Tsigkou et al. 2020).

El comportamiento cinético del crecimiento celular de *Serratia marcescens* (MZ413438) en los diferentes tratamientos (**Fig. 2b**) exhibió un patrón muy similar en comparación con los perfiles cinéticos de producción de hidrógeno (**Fig. 2c**). Como se muestra en la **figura 2b, c**, la mayor producción de hidrógeno se obtuvo durante la fase exponencial de crecimiento celular, seguida de una fase estacionaria que implicó la disminución y paro en la producción de hidrógeno. Este comportamiento es muy similar al reportado por Chong et al. (2009), quienes observaron que mediante fermentación por lote usando glucosa como sustrato, *Clostridium butyricum* EB6 empezó a producir hidrógeno en la fase de crecimiento exponencial y



**Fig. 4.** Análisis filogenético basado en secuencias de nucleótidos del gen 16S rARN de las principales bacterias productoras de bio-combustibles.

alcanzó el máximo volumen de producción en la fase estacionaria de crecimiento, deteniéndose en esta fase. En otro estudio en que se utilizó sacarosa como fuente de carbono, *Clostridium butyricum* CGS5 alcanzó la tasa más alta de producción de hidrógeno en la fase estacionaria y la producción se detuvo en esta misma fase (Chen et al. 2005).

De acuerdo con la revisión de las bases de datos NCBI y KEGG, la producción de hidrógeno por *Serratia marcescens* (MZ413438) en los diferentes tratamientos ocurrió a través de dos mecanismos metabólicos: 1) fijación de CO<sub>2</sub> por la vía de Calvin Benson Bassham, y/o 2) degradación de azúcares de melaza de caña de azúcar por la vía de la glucólisis, a partir de la cual se forma piruvato que se transforma metabólicamente en hidrógeno por la vía de la piruvato formiato liasa (Kumar et al. 2019). La ruta metabólica de NADH fue el segundo mecanismo metabólico de producción de hidrógeno (Salmerón et al. 2022).

Se ha reportado que bacterias del orden de las Enterobacteriales, como *Escherichia coli* y *Klebsiella*, utilizan la vía metabólica de la piruvato formiato liasa para la producción de hidrógeno (Bohnenkamp

et al. 2020). Otros estudios han reportado que la vía metabólica de NADH es utilizada por *Enterobacter aerogenes* para la producción de hidrógeno (Lu et al. 2009).

Los valores de los parámetros cinéticos del modelo Aiba-Edward obtenidos en el tratamiento T4 (**Cuadro I**) se pueden atribuir a que, como ha sido reportado por Kumar et al. (1998), la melaza contiene melanoidinas con propiedades antioxidantes que suelen ser tóxicas para muchos microorganismos, de modo que la mayor concentración de melaza pudo haber afectado el metabolismo de *Serratia marcescens* (MZ413438). Otros estudios, como el realizado por Fang et al. (2011), reportaron que la melaza contiene una alta concentración de sales que llega a causar problemas en la membrana celular de los microorganismos, por lo que las condiciones del tratamiento T4 pudieron haber afectado las funciones celulares de *Serratia marcescens* (MZ413438).

De acuerdo con los datos del **cuadro I**, con la adición de melaza se incrementaron los valores de  $\lambda$  e inversamente disminuyeron los de  $R_{max}$ , efecto que se hizo más notable con el incremento en la concentración. Este comportamiento puede deberse a que un

excedente en la concentración de carbohidratos en el medio de cultivo produce una acumulación excesiva de subproductos orgánicos en la célula, llegando a distorsionar el metabolismo de los microorganismos (Qiu et al. 2017).

Por sus propiedades energéticas, tanto el etanol como el 3-metil-1-butanol pueden llegarse a utilizar, disminuyendo con ello el consumo de combustibles derivados del petróleo. Además, la combustión de estos alcoholes tiene una menor emisión de CO<sub>2</sub> en comparación con la gasolina y el diésel, por lo que se ha incrementado su demanda en las últimas décadas (Roukas y Kotzekidou 2020).

El etanol y el 3-metil-1-butanol se produjeron en todos los tratamientos, obteniéndose diferentes valores de producción (Fig. 3). La producción más alta de ambos se alcanzó mediante el tratamiento T2, lo cual puede atribuirse a que los valores de pH obtenidos pudieron haber favorecido el metabolismo de producción de ambos alcoholes (Fig. 2a). Maárof et al. (2020) reportaron que los valores más altos de producción de alcoholes se obtuvieron a pH 7, utilizando melaza de caña de azúcar como sustrato.

Las diferencias de producción de los alcoholes etanol y 3-metil-1-butanol entre los tratamientos T1 y T2, se puede deber a que en el tratamiento T1 se tuvo una concentración limitada de sustrato. Se ha reportado que, en condiciones limitadas de sustrato, las bacterias sólo utilizan el sustrato para satisfacer sus necesidades fisiológicas de crecimiento, lo que lleva a una disminución de la producción de otros metabolitos como los alcoholes (de Amorim et al. 2012).

La producción más baja de etanol y 3-metil-1-butanol en el tratamiento T4 en comparación con los tratamientos T1, T2 y T3 puede deberse a que la presión osmótica de la célula se incrementa a altas concentraciones de carbohidratos, lo cual afecta el crecimiento celular y el metabolismo de las bacterias (Wang et al. 2021). En el tratamiento T0 la producción de ambos alcoholes puede atribuirse a que el medio contenía 15 g/L de NaHCO<sub>3</sub> y *Serratia marcescens* (MZ413438) utilizó esta fuente de carbono inorgánico como sustrato para el crecimiento celular, produciendo moléculas orgánicas más complejas y estructuradas a partir de diferentes rutas metabólicas (Thakur et al. 2018).

Se ha reportado que bacterias heterótrofas tienen la capacidad metabólica de fijar y reducir carbono inorgánico (como el bicarbonato) a través de la ruta anaplerótica (Spona et al. 2020).

La síntesis metabólica de producción de etanol que llevó a cabo *Serratia marcescens* (MZ413438) en los tratamientos T0 a T4 pudo haber ocurrido a

través de la ruta metabólica de acetyl-CoA. Este metabolismo de producción también ha sido reportado para algunas cepas bacterianas como *Escherichia coli*, *Streptococcus* y *Neisseria* (Tagaino et al. 2019, Bohnenkamp et al. 2020).

De acuerdo con lo revisado en la base de datos KEGG, la síntesis metabólica de 3-metil-1-butanol que utilizó *Serratia marcescens* (MZ413438) en los diferentes tratamientos ocurrió a través de la vía metabólica de 2-cetoácidos. Esta ruta metabólica de síntesis de 3-metil-1-butanol también ha sido reportada para *E. coli* (Connor et al. 2010). Otros estudios han demostrado que *Corynebacterium glutamicum* también utiliza la vía metabólica de 2-cetoácidos para sintetizar 3-metil-1-butanol (Xiao et al. 2016).

## CONCLUSIONES

La producción simultánea de hidrógeno, etanol y 3-metil-1-butanol usando melaza de caña de azúcar como sustrato reveló la versatilidad metabólica de *Serratia marcescens* (MZ413438) para la degradación de residuos agroindustriales y la producción de metabolitos de interés energético.

Los valores de pH obtenidos en los tratamientos con diferentes concentraciones de carbohidratos de melaza de caña de azúcar desempeñaron un papel muy importante en el metabolismo de *Serratia marcescens* (MZ413438) para la obtención de los tres productos, cuyos máximos valores de producción se obtuvieron con el tratamiento T2, que contenía 30 g/L de azúcares totales de melaza de caña de azúcar. Los datos obtenidos también revelaron la sensibilidad de *Serratia marcescens* (MZ413438) a concentraciones de melaza de 60 g/L, con las cuales se obtuvieron bajos valores de producción.

La información que aporta este estudio destaca la relevancia de *Serratia marcescens* (MZ413438) para el tratamiento de residuos agroindustriales, con un gran potencial para la producción de biocombustibles derivado de su adaptación metabólica a una gran diversidad de sustratos en periodos muy cortos de fermentación.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua por las instalaciones e infraestructura que facilitó para la realización de este estudio.

## REFERENCIAS

- Almuharef I., Rahman M.S. y Qin W. (2019). Enzymatic conversion of glycerol to 2,3-butanediol and acetoin by *Serratia proteamaculans* SRWQ1. *Waste and Biomass Valorization* 10 (7), 1833-1844. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0221-1>
- Álvarez C.L., Balderas V. y de León A. (2020). Coproduction of hydrogen, ethanol and 2,3-butanediol from agro-industrial residues by the Antarctic psychrophilic GA0F bacterium. *International Journal of Hydrogen Energy* 45 (49), 26179-26187. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.02.105>
- APHA-AWWA-WPCF (2017). Standard methods for the examination of water and wastewater. 23rd ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation, Washington DC, EUA, 1796 pp.
- Bai F., Dai L., Fan J., Truong N., Rao B., Zhang L. y Shen Y. (2015). Engineered *Serratia marcescens* for efficient (3R)-acetoin and (2R,3R)-2,3-butanediol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 42 (5), 779-786. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1598-5>
- Bohnenkamp A.C., Kruis A.J., Mars A.E., Wijffels R.H., Van Der Oost J., Kengen S.W.M. y Weusthuis R.A. (2020). Multilevel optimisation of anaerobic ethyl acetate production in engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology for Biofuels* 13 (1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01703-1>
- Chen W.M., Tseng Z.J., Lee K.S. y Chang J.S. (2005). Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy* 30 (10), 1063-1070. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.09.008>
- Chong M.L., Rahim R.A., Shirai Y. y Hassan M.A. (2009). Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent. *International Journal of Hydrogen Energy* 34 (2), 764-771. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.10.095>
- Cisneros S., Veana F., Arjona M.A., Álvarez C. y Pérez S.B. (2021). Optimization of variables from the anaerobic digestion process of cheese whey in biogas production. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 37, 307-318. <https://doi.org/10.20937/RICA.53879>
- CONADESUCA (2016). Melazas de caña de azúcar y su uso en la fabricación de dietas para ganado. Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar. Boletín, Ciudad de México, México, 9 pp.
- Connor M.R., Cann A.F. y Liao J.C. (2010). 3-Methyl-1-butanol production in *Escherichia coli*: Random mutagenesis and two-phase fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (4), 1155-1164. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2401-1>
- Corbo P., Migliardini F. y Veneri O. (2011). Hydrogen fuel cells for road vehicles. Springer Verlag, New York, EUA, 246 pp. <https://doi.org/10.1007/978-0-85729-136-3>
- De Amorim E.L.C., Sader L.T. y Silva E.L. (2012). Effect of substrate concentration on dark fermentation hydrogen production using an anaerobic fluidized bed reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166 (5), 1248-1263. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9511-9>
- De Godoi L.A.G., dos Santos C.E.D., Foresti E. y Damianovic M.H.R.Z. (2017). Evaluating and refining alkalinity calculations due to sulfide and bicarbonate accessed by titration in anaerobic sulfate-reducing bioreactors. *Water, Air, & Soil Pollution* 228 (9), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3518-y>
- De Vrieze J., Hennebel T., van den Brande J., Bilal R., Bruton T., Vankelecom I., Verstraete W. y Boon N. (2014). Anaerobic digestion of molasses by means of a vibrating and non-vibrating submerged anaerobic membrane bioreactor. *Biomass and Bioenergy* 68, 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.06.009>
- DuBois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. y Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28 (3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Fang C., Boe K. y Angelidaki I. (2011). Anaerobic codigestion of desugared molasses with cow manure; focusing on sodium and potassium inhibition. *Bioresource Technology* 102 (2), 1005-1011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.077>
- Fujikawa H., Kai A. y Morozumi S. (2004). A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures. *Food Microbiology* 21 (5), 501-509. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.01.007>
- Hall B.G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution* 30, 1229-1235. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst012>
- Huerta E.A., López H.A., Gómez G., Gómez J.A. y Pérez A. (2022). Uncertainty of the life cycle assessment of biogas power. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 38, 271-287. <https://doi.org/10.20937/RICA.54121>
- Hung C.H., Chang Y.T. y Chang Y.J. (2011). Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems—A review. *Bioresource Technology* 102 (18), 8437-8444. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.084>

- ISO (2022). By-products. International Sugar Organization [en línea]. <https://www.isosugar.org/sugarsector/by-products> 30/10/2022
- KEGG (2022). Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [en línea]. <https://www.kegg.jp> 18/11/ 2022
- Kumar M., Kumar, M., Pandey A. y Thakur I.S. (2019). Genomic analysis of carbon dioxide sequestering bacterium for exopolysaccharides production. *Scientific Reports* 9 (1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41052-0>
- Kumar V., Wati L., Nigam P., Banat I.M., Yadav B.S., Singh D. y Marchant R. (1998). Decolorization and biodegradation of anaerobically digested sugarcane molasses spent wash effluent from biomethanation plants by white-rot fungi. *Process Biochemistry* 33 (1), 83-88. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(97\)00047-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(97)00047-2)
- Lu Y., Zhao H., Zhang C., Lai Q. y Xing X.H. (2009). Perturbation of formate pathway for hydrogen production by expressions of formate hydrogen lyase and its transcriptional activator in wild *Enterobacter aerogenes* and its mutants. *International Journal of Hydrogen Energy* 34 (12), 5072-5079. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.04.025>
- Maárof M.I.N., Chala G.T., Gunness D. y Saad I. (2020). A study on the performance analysis of bioethanol produced from sugarcane molasses in SI engine. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 863 (1), 1-10. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/863/1/012064>
- Miyat M.E., Ören İ., Özkan E. y Argun H. (2020). Sequential dark and photo-fermentative hydrogen gas production from agar embedded molasses. *International Journal of Hydrogen Energy* 45 (60), 34730-34738. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.12.174>
- Muloiwa M., Nyende S. y Dinka M. (2020). Comparison of unstructured kinetic bacterial growth models. *South African Journal of Chemical Engineering* 33, 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2020.07.006>
- NCBI (2022). Gene. National Center for Biotechnology Information [en línea]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> 18/11/2022
- Ogden J.M. (2002). Hydrogen: The fuel of the future? *Physics Today* 55 (4), 69-75. <https://doi.org/10.1063/1.1480785>
- Padan E., Bibi E., Ito M. y Krulwich T.A. (2005). Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1717 (2), 67-88. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.010>
- Penniston J. y Gueguim E.B. (2018). Impact of medium pH regulation on biohydrogen production in dark fermentation process using suspended and immobilized microbial cells. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 32 (1), 204-212. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1408430>
- Qiu C., Shi P., Xiao S. y Sun L. (2017). Effects of pH and substrate concentrations on dark fermentative biohydrogen production from xylose by extreme thermophilic mixed culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33 (1), 1-7. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2178-1>
- Roukas T. y Kotzekidou P. (2020). Rotary biofilm reactor: A new tool for long-term bioethanol production from non-sterilized beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae* in repeated-batch fermentation. *Journal of Cleaner Production* 257, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120519>
- Salmerón I., Guzmán C.L., Ramos V.H., Pérez I., Sáenz J. y Cisneros S. (2022). Hydrogen and alcohols production by *Serratia* sp. from an inorganic carbon source. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization* 58, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2022.101914>
- Salokhe M.D. y Govindwar S.P. (1999). Effect of carbon source on the biotransformation enzymes in *Serratia marcescens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15 (2), 229-232. <https://doi.org/10.1023/A:1008875404889>
- Santos D., Casari L.P., Lucas S.C.O., Romão L.P.C. y Porto A.L.M. (2020). Butanediol production from glycerol and glucose by *Serratia marcescens* isolated from tropical peat soil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 26, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101615>
- Spona M., Braun A., Huber C., Eisenreich W., Griebler C., Kappler A. y Elsner M. (2020). Substrate-dependent CO<sub>2</sub> fixation in heterotrophic bacteria revealed by stable isotope labelling. *FEMS Microbiology Ecology* 96 (6), 1-13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa080>
- Tagaino R., Washio J., Abiko Y., Tanda N., Sasaki K. y Takahashi N. (2019). Metabolic property of acetaldehyde production from ethanol and glucose by oral *Streptococcus* and *Neisseria*. *Scientific Reports* 9 (1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46790-9>
- Thakur I.S., Kumar M., Varjani S.J., Wu Y., Gnansounou E. y Ravindran S. (2018). Sequestration and utilization of carbon dioxide by chemical and biological methods for biofuels and biomaterials by chemoautotrophs: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology* 256, 478-490. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.039>
- Toledo A., Villafán F., Arreola J., Razo E. y Méndez H.O. (2020). Comparative evaluation of the mesophilic and thermophilic biohydrogen production at optimized conditions using tequila vinasses as substrate. *International Journal of Hydrogen Energy* 45 (19), 11000-11010. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.02.051>

- Tsigkou K., Tsafraikidou P., Athanasopoulou S., Zafiri C. y Kornaros M. (2020). Effect of pH on the anaerobic fermentation of fruit/vegetables and disposable nappies hydrolysate for bio-hydrogen production. *Waste and Biomass Valorization* 11 (2), 539-551. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00854-z>
- Tunçay E.G., Erguder T.H., Eroğlu İ. y Gündüz U. (2017). Dark fermentative hydrogen production from sucrose and molasses. *International Journal of Energy Research* 41 (13), 1891-1902. <https://doi.org/10.1002/er.3751>
- Wang J. y Wan W. (2009). Kinetic models for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* 34 (8), 3313-3323. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.031>
- Wang S., Tian R., Liu B., Wang H., Liu J., Li C., Li M., Etareri S. y Li B. (2021). Effects of carbon concentration, oxygen, and controlled pH on the engineering strain *Lactiplantibacillus casei* E1 in the production of bioethanol from sugarcane molasses. *AMB Express* 95, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01257-x>
- Xiao S., Xu J., Chen X., Li, X., Zhang Y. y Yuan Z. (2016). 3-Methyl-1-butanol biosynthesis in an engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Biotechnology* 58 (5), 311-318. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9929-y>