

EFFECTO DE DOS FUENTES DE NITRÓGENO (ORGÁNICA E INORGÁNICA) EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE SUERO DE LECHE USANDO LA CEPA MODIFICADA *E. COLI* WDHL

Granados Avalos, E. ⁽¹⁾; De León Rodríguez, A. ⁽²⁾; Rosales Colunga, L.M. ⁽²⁾; Falcon, E. ⁽²⁾

(1)Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Querétaro (2) División de Biología Molecular. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

RESUMEN

La producción de hidrógeno como biocombustible ha tenido un gran auge en los últimos años, debido a la necesidad de reemplazar los combustibles fósiles por las emisiones contaminantes, ya que éste es más eficiente y sólo libera agua como residuo. Se evaluó el efecto de 2 fuentes diferentes de nitrógeno: extracto de levadura (orgánica) y sulfato de amonio (inorgánica) sobre la producción de hidrógeno con la cepa modificada *E. coli* WDHL usando como sustrato el lactosuero. La mejor producción (113 mL) se obtuvo con el extracto de levadura en las primeras 24 h, ya que contiene aminoácidos libres que pueden ser incorporados a los compuestos nitrogenados, resultando en un menor gasto de energía; por lo que es la mejor opción si se busca una rápida producción de H₂. En el caso del sulfato de amonio la producción se vio afectada, probablemente por la liberación del ión ácido después de la incorporación del ión amonio provocando la baja del pH. Como perspectiva se pretendería buscar otras fuentes orgánicas de nitrógeno y las concentraciones óptimas; además de llevar el experimento a nivel biorreactor para controlar las condiciones, en especial el pH.

INTRODUCCIÓN

La producción biológica de hidrógeno como biocombustible ha sido un tema muy apreciado en la investigación en los últimos años, ya que es un recurso limpio y renovable. La principal ventaja del bio-hidrógeno es que carece de emisiones contaminantes, ya que su combustión produce solamente agua. Además posee un alto rendimiento energético de 122 kJ/g, 2.75 veces más altos que los combustibles hidrocarbonados.

En el 2005 se reportó que México produce alrededor de 14 mil toneladas de queso anualmente; esto indica que la cantidad de suero es notable ya que de cada 10 unidades de leche con grasa se produce 1 de queso y 9 de suero líquido (USDEC, 2005). La mayoría es usado como alimento para animales o el hombre. Sin embargo, aún existe una cantidad muy grande de lactosuero que es desechado y presenta un serio problema de disposición para la industria del queso. Por ejemplo en la región del Valle de Tulancingo, se calcula que diariamente se arrojan 500 000 litros de suero de leche al drenaje municipal, este claro sin haber recibido ningún tratamiento (Chavarría et al., 2006).

El suero de leche es un residuo líquido de la fabricación del queso y representa hasta el 80% del medio original de fermentación. El lactosuero contiene alrededor del 4.5-5% de lactosa, 0.6-0.8% de proteína soluble, 0.4-0.5% (w/v) de lípidos y concentración variable de sales minerales lo cual es un sustrato suficiente para ser usado para propósitos de fermentaciones.

Existen 2 reacciones metabólicas microbianas principales para la producción hidrógeno en las enterobacterias, como por ejemplo *Escherichia coli* (figura 1). La primera consiste en la ruptura del piruvato por medio de la piruvato-formiato liasa (*pfl*), que resulta en acetil-CoA y formiato. El formiato, bajo condiciones anaeróbicas, producirá hidrógeno más dióxido de carbono por acción del sistema formiato-hidrógeno liasa (*fhl*).

El gen *hycA* codifica para el regulador negativo del regulón de formiato, por lo que las cepas con el gen *hycA* defectuoso muestran un incremento en la actividad de la hidrogenasa y una

sobreproducción de hidrógeno (Sauter, et al., 1992). El gen *lacI* fue suprimido para expresar constitutivamente el operón *lac*, que codifica los genes necesarios para metabolizar la lactosa en *E. coli*, e incrementar la velocidad de consumo de lactosa.

En un estudio previo hecho en el laboratorio se observó que usando cloruro de amonio y la cepa *E. coli* WDHL se obtenía un 39% más de hidrógeno. Se logró alcanzar una producción de 250 mL en 250 h. En un artículo de Mohd, Hisham y Wan (2008) donde se probaron distintas fuentes orgánicas para mejorar la producción de H₂ en *C. acetobutylicum*, la mejor fue extracto de levadura; llegando a producir 300 mL.

En este trabajo se pretende comparar dos fuentes de nitrógeno (orgánica e inorgánica) para determinar cuál permite un mayor aumento en la producción de hidrógeno.

METODOLOGÍA

La transformación se había hecho previamente a partir de la cepa silvestre *E. Coli* W3110 de acuerdo al método Datsenko and Wanner.

Se utilizó la cepa *Escherichia coli* WDHL para este estudio de producción de hidrógeno, que se encontraba almacenada en glicerol al 20% a -80 °C. *E. Coli* WDHL fue sembrada en 2 placas de Petri con medio LB (Luria-Bertani) sólido e incubado durante 16 h a 37 °C. El microorganismo fue activado para la fermentación transfiriendo una colonia a 90 mL de medio LB líquido e incubado por 12 h a 37 °C. Posteriormente se transfirió a un subcultivo de 3 L de LB fresco (10 mL por cada litro de LB que se vaya a inocular) por 48 h a 37 °C, y éste fue utilizado como inóculo para la fermentación. Para obtenerlo se centrifugaron los 3 L de LB a 7000 rpm durante 10 minutos para obtener la pastilla y resuspenderla en 100 mL de medio mínimo M9.

La fermentación fue llevada a cabo a un volumen de trabajo de 100 mL en botellas serológicas de 120 mL a 37 °C y agitadas a 200 rpm. Estas contenían suero de leche a una concentración de 20 g/L junto con el medio M9 previamente pasteurizados, y se le adicionó 1 mL/L de elementos traza y la fuente de nitrógeno orgánico (extracto de levadura a 3 ó 5 g/L) o inorgánico ((NH₄)₂SO₄ a 7 u 11 g/L) según corresponda. Se hizo un triplicado de las 2 concentraciones de nitrógeno orgánico, un duplicado del control (sin fuente de nitrógeno adicional) y no hubo duplicado para las botellas con fuente nitrógeno inorgánico, el cual fue usado como control negativo. Todos los medio anteriores fueron ajustados a pH 7.5

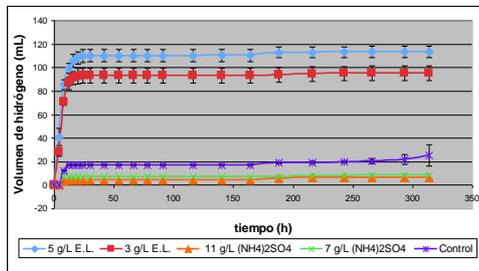
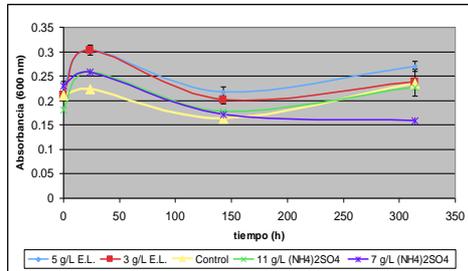
A cada medio se le agregó el 10% de inóculo y fueron selladas con tapones de hule y anillos metálicos para conservar las condiciones anaeróbicas. Finalmente las botellas se mantuvieron a 37°C a 200 rpm durante 300 h. El pH de los cultivos no fue controlado durante la fermentación.

Se midió el volumen de hidrógeno usando una bureta invertida llena de una solución de KOH 1 M, para capturar el CO₂ de la corriente de gas y permitir sólo el paso del H₂. A demás se tomó una muestra líquida de 1.5 mL antes de inocular y después de inocular todas las botellas serológicas, 24, 143 y 314 horas después. Se centrifugaron las muestras por 5 min a 13 000 rpm para obtener la pastilla, la cual fue resuspendida en medio M9. Se leyó la densidad óptica a 600 nm. El sobrenadante fue filtrado y analizado en HPLC para medir ácidos orgánicos, lactosa, glucosa y galactosa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la gráfica 1 se puede observar que todas tuvieron un comportamiento similar ya que hubo un pequeño aumento en biomasa de 0.2 a 0.3 DO_{600nm} y que esta producción máxima se presentó aproximadamente a las 24 h. Esto coincide con la gráfica 2 que muestra cómo a entre las 20 y 30 h se alcanza el mayor volumen de hidrógeno. El máximo volumen de H₂ fueron 113 mL con el extracto de levadura a 5 g/L y la máxima de sulfato de amonio se encontró con

7 g/L siendo esta de 8.5 mL. Por otro lado se encontró que usando el sulfato de amonio se obtuvo una pobre producción de hidrógeno, siendo ésta menor incluso que el control. Ambas fuentes coinciden en que su producción prácticamente se detuvo a las 30 h y ésta no logró reanudarse. Aunque la producción inicial de hidrógeno sí estuvo relacionada con la biomasa, no es necesario que se presente una alta biomasa para una alta producción, pues los cultivos se encuentran en condiciones anaeróbicas. Al inicio de la fermentación el pH fue de 7.5 y al finalizar de 5, en todos los casos.

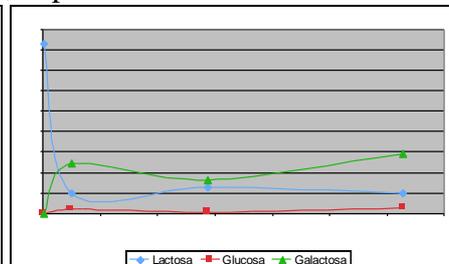
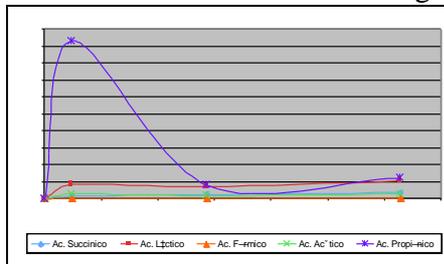


Gráfica 1: Producción de biomasa

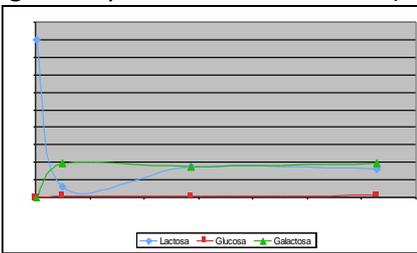
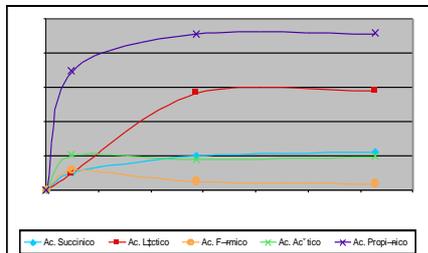
Gráfica 2: Producción de hidrógeno

Se observa en las siguientes gráficas (3-6) la producción de ácidos orgánicos y el consumo de azúcares, fueron divididos de acuerdo a la fuente de nitrógeno y a la concentración utilizada. Como se puede observar en las gráficas del extracto de levadura el consumo de lactosa fue muy rápido, en especial en las primeras 24 h que es cuando se produce más hidrógeno. También se aprecia que la concentración de glucosa se mantuvo baja ya que fue lo primero en consumirse al separarse la lactosa en los 2 monómeros que la conforman (glucosa y galactosa), por el contrario la concentración de galactosa se mantuvo indicando que la bacteria no fue capaz de incorporarla.

Con respecto a los ácidos orgánicos, se muestra una baja concentración de ácido fórmico, lo que indica que este se consumía rápidamente para la producción de hidrógeno. Pero se observa una alta concentración de ácido propiónico y una baja concentración de los demás ácidos en la concentración de 3 g/L, el primero se consideró un error analítico.

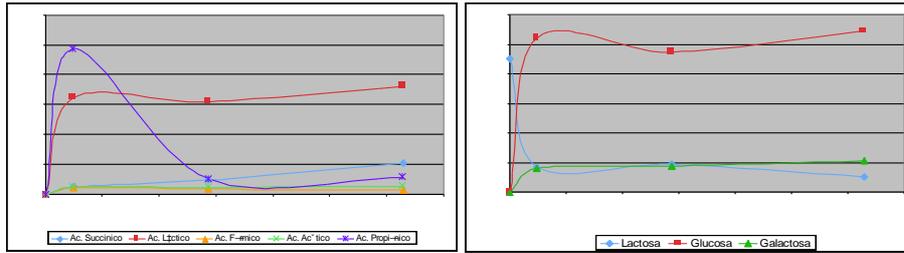


Gráficas 3-4: Producción de ácidos orgánicos y consumo de azúcares (3 g/L E.L.)

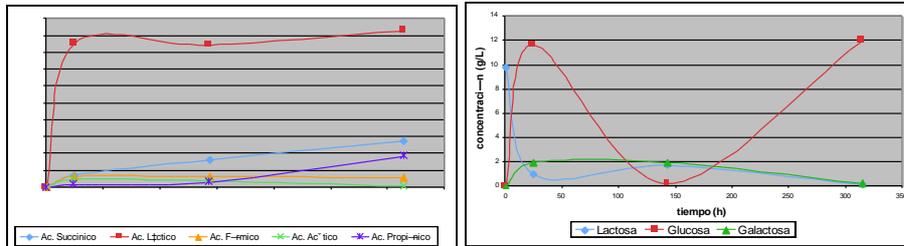


Gráficas 5-6: Producción de ácidos orgánicos y consumo de azúcares (5 g/L E.L.)

En las gráficas 7-10 se observan los datos obtenidos del sulfato de amonio, de igual manera la lactosa fue consumida dentro de las primeras 24 h. También se encontró una concentración anormal de glucosa considerado otro error analítico, se cree que el pico del cromatograma se vio amplificado al mezclarse con el sulfato. El ácido fórmico, de igual manera, casi no se detectó indicando su rápida incorporación a las células. El ácido láctico se mostró muy alto en ambas concentraciones pues no pudo ser reutilizado por las bacterias



Gráficas 7-8: Producción de ácidos orgánicos y consumo de azúcares (7 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)



Gráficas 9-10: Producción de ácidos orgánicos y consumo de azúcares (11 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

La fuente orgánica resultó ser más eficiente ya que la célula fue capaz de tomar los aminoácidos y péptidos libres del extracto de levadura e incorporarlos directamente en las proteínas o transformarlos en otros componentes celulares nitrogenados. En contraste, la célula gasta más energía y tiempo en sintetizar aminoácidos para la síntesis de proteínas a partir de fuentes inorgánicas de nitrógeno. También existe la posibilidad de que los aminoácidos presentes en el extracto de levadura se transformen en piruvato y entren a la vía de producción de hidrógeno.

El sulfato de amonio afectó la producción porque las sales de amonio comúnmente producirán condiciones ácidas a partir de que el ión amonio es utilizado y el ión ácido es liberado (Stanbury et. al), y el pH ácido es perjudicial para la producción de hidrógeno. Se piensa también que la concentración era muy alta y causó problemas osmóticos a la bacteria.

CONCLUSIONES

Se encontró una producción más rápida de hidrógeno usando la fuente orgánica, comparada con los resultados obtenidos previamente en el laboratorio usando cloruro de amonio. Es mejor utilizar la fuente orgánica de nitrógeno y no se mostró una diferencia significativa de producción entre las concentraciones, comparada con la fuente inorgánica (sulfato de amonio). Probablemente la caída rápida de pH afectó la producción de hidrógeno.

Como perspectiva se podría probar con otras fuentes orgánicas de nitrógeno, inclusive algunas más económicas. A demás de llevar a cabo el experimento a nivel biorreactor para controlar el pH y verificar si se puede aumentar la producción de hidrógeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rosales Colunga, L.M.; Razo Flores, E., "Hydrogen Production by *Escherichia coli* Δ hicA Δ lac using cheese whey as a substrate", *Int J Hydrogen Energy*, 35, 491-499, **2010**.
- Davila Vazquez, G.; Alatrsite Modragón, F., "Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration an pH", *Int J Hydrogen Energy*, 33, 4989-4997, **2008**.
- Bisaillon, A.; Turcot, J.; Hallenbeck, P.C., "The effect of hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*", *Int J Hydrogen Energy*, 31, 1504-1508, **2006**.
- Mohd, S.; Hisham, S. "Effect of Nitrogen Source and Carbon to Nitrogen Ratio on Hydrogen Producing using *C. acetobutylicum*", *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4, 393-401, **2008**
- Razo Flores, E., Rosales Colunga, L.M.; De León Rodríguez, A. "Effect of ammonium on hydrogen production by genetically engineered *E. coli* strains designed to overproduce hydrogen from cheese whey". Poster