

# **“EFECTO DE LA FUENTE NITROGENADA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDROGENO POR LA CEPA MODIFICADA *Escherichia Coli WΔHLpMP* UTILIZANDO SUERO DE LECHE COMO SUSTRATO”**

**Hernández Mendoza A.<sup>1</sup>, De Leon Rodríguez A. <sup>2</sup>, Rosales Colunga L.M. <sup>2</sup>, Falcon Torres E.<sup>2</sup>  
Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de Querétaro<sup>1</sup>/División de Biología Molecular, Laboratorio de Biotecnología Molecular Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica IPICYT<sup>2</sup>**

## **RESUMEN**

Este trabajo abordo la producción biológica de hidrogeno a partir de la fermentación utilizando suero de leche como sustrato, enriquecido con extracto de levadura como fuente de nitrógeno adicional para enriquecer el medio y observar el efecto de una fuente de nitrógeno orgánica sobre la producción de biogás .La fuente utilizada fue extracto de levadura .El experimento constó de 10 botellas serológicas en total, 1 control negativo, 1 que contenía sulfato de amonio y el experimento por triplicado, bajo dos concentraciones 5g/L y 3 g/L de extracto de levadura. Fueron inoculadas con la cepa de *E. Coli WDHLpMP* y mantenidas en condiciones anaerobias, 37°C, y agitación 150 rpm.La producción de hidrogeno se midió por desplazamiento de agua, en una bureta llena con solución de hidróxido de potasio , que atrapara el CO<sub>2</sub> y así obtener solo el valor correspondiente a H<sub>2</sub> .La medición se llevo a cabo cada cuatro horas durante las primeras 24 horas, después de monitoreo conforme avanzaba el experimento y se llevaba a cabo la producción. Al igual se tomaron muestras del medio a las 0, 20 ,193 ,355 horas, de las cuales se obtuvo la densidad, a la vez que se filtraron para ser analizadas por cromatografía liquida de alta resolución (HPLC) y observar la presencia de ácidos orgánicos y azúcares en el medio conforme se llevaba a cabo la fermentación. Esta se llevo a cabo durante 15 días (355 hrs).En los resultados obtenidos se pudo observar que la producción de H<sub>2</sub> (en comparación con la llevada a cabo por la cepa WDHL fue menor a la vez que se prolongo el tiempo de fermentación teniendo un estado de latencia más largo de lo observado en otros experimentos. El pH inicial fue de 7.5 ,bajando en las últimas muestras a 5 estos resultados sugieren el efecto del pH sobre la producción ya que fue bajo condiciones no controladas

## **INTRODUCCIÓN**

La mayor parte de la energía que se consume en el mundo proviene de los combustibles fósiles, los cuales son recursos no renovables. Esto ha resultado en tanto al aumento en la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera y el rápido agotamiento de recursos fósiles. Por estas razones, se exploran nuevas fuentes sostenibles de energía que puedan sustituirlos tales como procesos que producen energía a partir de biomasa la cual está disponible en forma de residuos orgánicos, tales como los residuos sólidos municipales, el estiércol, los bosques y residuos agrícolas.(Dávila y col. 2007).A partir de estos procesos se puede generar la producción de biogás como el hidrogeno ya que existen indicios de que el hidrógeno podría convertirse finalmente en un componente importante del balance energético de una economía mundial. Muchas bacterias contienen enzimas (hidrogenasas) que pueden producir hidrógeno durante la fermentación de una variedad de sustratos. (Logan y col. 2002).La fermentación de la biomasa o los hidratos de carbono presenta una vía prometedora de producción biológica de hidrogeno utilizando glucosa, almidón y celulosa, así como diferentes materiales de desecho orgánicos. El hidrógeno es ampliamente reconocido como un recurso energético limpio y eficiente del futuro. Tiene el más alto contenido de energía por unidad de peso que cualquier otro combustible conocido y es el único combustible común que no es químicamente unido a carbono. Por lo tanto, la quema de hidrógeno no contribuye al efecto invernadero, agotamiento del ozono y la lluvia ácida. Cuando

se quema hidrógeno en aire, emite vapor de agua y calor tal como mencionan Kaushik Nath . Debabrata Das (2004).

## **JUSTIFICACIÓN**

Probar la efectividad en la producción de biogás (hidrogeno) de la cepa *E.coli W3110* modificada (WΔHLpMP) bajo condiciones enriquecidas del sustrato con extracto de levadura como fuente orgánica de nitrógeno.

## **OBJETIVO**

Observar la producción de H<sub>2</sub> de la cepa *E.coli W3110* modificada (WΔHLpMP) bajo la influencia del sustrato suero de leche implementado con una fuente orgánica de nitrógeno como el extracto de Levadura.

## **MATERIALES Y METODOS**

-Preparar medio LB sólido (10 g/L bacto tripotona, 5g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 500µl NaOH 2N, 15 g/L agar bacteriológico) sembrar la cepa WDHLpMP mantener overnight a 37°. En un matraz con 90 ml de medio LB liquido inocular una colonia, más 200 µL kanamicina. Llevar a crecimiento por 16 hrs. Colocar 30 ml de medio LB inoculado en 1L de medio LB con 200 µl de antibiótico (kanamicina). Dejar incubar por 48 hrs. A 37 ° con agitación. Esterilizar botellas serológicas con tapones.

Preparar medio mínimo M9 (0.5 g/L NaCl, 6 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 CaCl<sub>2</sub>, 40 µL tiamina al 0.1%). Preparar el medio de suero de leche con 20g/L suero de leche, agregar 1 ml/L de elementos traza más 100mL/L de MgSO<sub>4</sub> y las fuentes de nitrógeno (5 y 3 g/L extracto de levadura, 7 y 11 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), aforar con medio M9, pasteurizarlo a 65° durante 25 min y 20 min en hielo. Traspasar inoculo a botes de centrifugación y llevar a cabo el proceso a 7000 rpm 10 min. Mantener el precipitado y suspender la pastilla celular en 150 ml de medio M9. Colocar en cada botella serológica 90 ml del medio (suero de leche preparado). Agregar 10 ml del inoculo. Sellar botellas serológicas. Tomar la muestra líquida inicial y monitorear cada 4 horas (durante las primeras 24 horas) el desplazamiento llevado a cabo en la bureta llena con solución de KOH 1M con el fin de que absorba el dióxido de carbono en la producción de gas y observar el desplazamiento del hidrogeno solamente ((Logan y col. 2002). Monitorear conforme avanza el experimento. Tomar muestra líquida a las 24 hrs. otra intermedia y una final de acuerdo a la duración del experimento y conforme avanza. Medir absorbancias para conocer la densidad y filtrar las muestras para analizarlas en HPLC (High-Pressure Liquid Chromatography).

## **RESULTADOS**

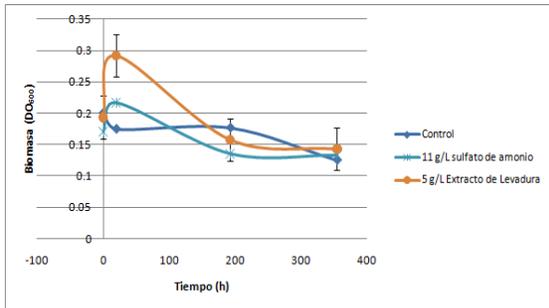
**Grafica 1.-Producción de H<sub>2</sub> utilizando extracto de levadura a una concentración de 5 g/L**

**Grafica 2.-Producción de H<sub>2</sub> utilizando extracto de levadura a una concentración de 3g/L**

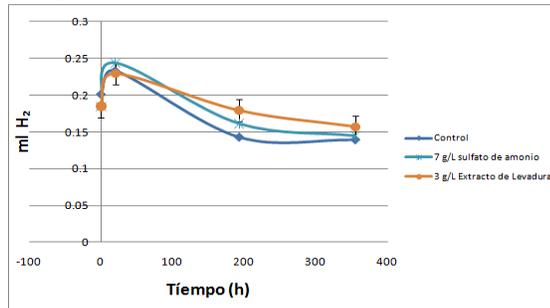
La producción de H<sub>2</sub> observada en las graficas muestra la baja producción inicial que se obtuvo durante la fermentación al igual se distingue el tiempo sin producción que se obtuvo, generando H<sub>2</sub> nuevamente a las

340 Hrs siendo un tiempo prolongado y en bajas cantidades, lo que sugiere la poca efectividad de la cepa, no obteniendo los resultados esperados debido al gen insertado pflB.

### 3.1



### 3.2

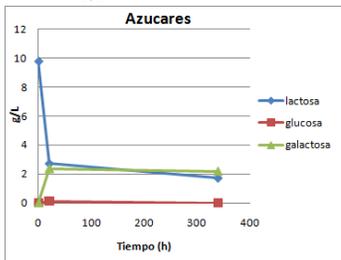


Horas	Control	5g/L extracto de levadura	11 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0	0.2002	0.1936	0.1707
20	0.1747	0.2923	0.2172
193	0.1766	0.1576	0.135
355	0.1251	0.1428	0.1325

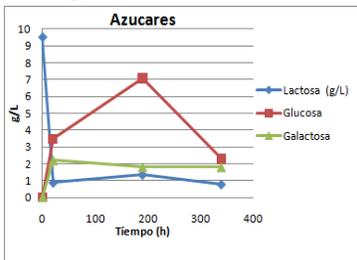
horas	Control	3 g/L Extracto de Levadura	7 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0	0.201	0.1843	0.1849
20	0.233	0.2435	0.2294
193	0.1429	0.1613	0.179
355	0.1393	0.1447	0.157

Grafica 3.1-3.2-Densidad óptica a 600 nm a las 0, 20, 193 Hrs. Correspondiente a la concentración 5g/L(3.1) y 3g/L(3.2) de extracto de levadura. A. 11 g/L y 7 g/L corresponden a sulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, como control negativo y sus respectivos controles positivos. La Biomasa tuvo un ascenso durante las primeras 24 horas, siendo producto de la fermentación y la adición del extracto de levadura que favoreció el crecimiento. Sin embargo al seguir la fermentación la biomasa tiende a disminuir, siguiendo el patrón normal, debido a la estabilidad del medio.

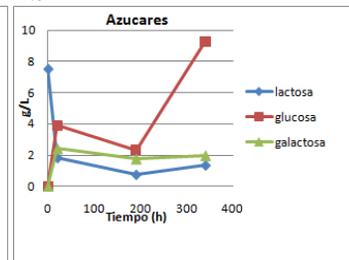
### 4.1



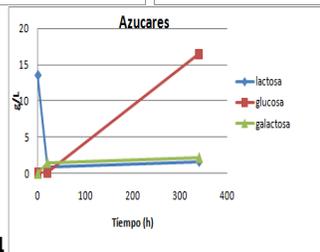
### 4.2



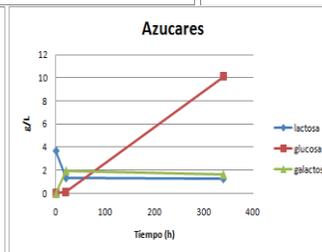
### 4.3



### 4.4

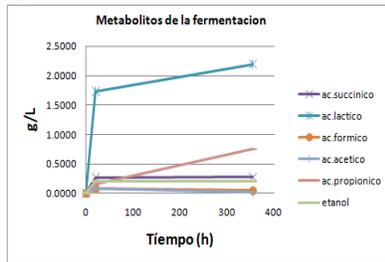


### 4.5

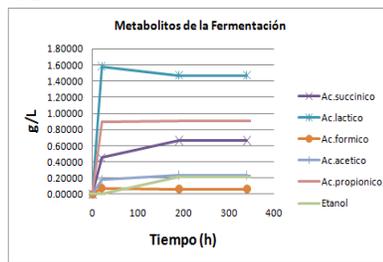


Grafica 4.1-4.5. Concentración de azúcares (lactosa, glucosa y galactosa) en la botella control (4.1), la correspondiente a 5g/L (4.2) y 3g/L (4.3) de extracto de levadura y sus respectivos controles negativos 11g/L (4.4) y 7g/L (4.5) de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

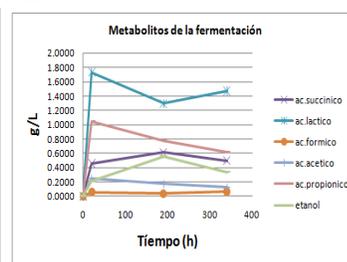
5.1



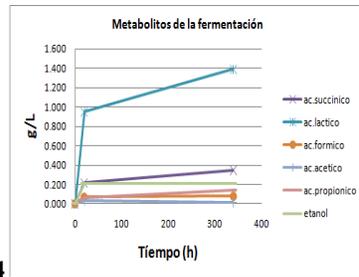
5.2



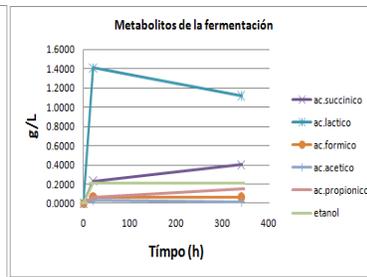
5.3



5.4



5.5



Grafica 5.1-5.5. Concentración de ácidos orgánicos (ac.succínico, ac.láctico, ac.fórmico, ac.acético, ac.propiónico y etanol) en la botella control (4.1), la correspondiente a 5g/L (4.2) y 3g/L (4.3) de extracto de levadura y sus respectivos controles negativos 11g/L (4.4) y 7g/L (4.5) de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Observando los resultados de biomasa y concentración de azúcares así como de ácidos orgánicos para mantener un control de la fermentación, podemos observar el alto contenido de ácido láctico lo que resulta en el descenso del pH, siendo otro factor importante para la producción de  $\text{H}_2$  y al cual pueden deberse las bajas cantidades de biogás. A la vez que se distingue que el consumo de glucosa fue mayor que galactosa, sin embargo existió ruido en el pico obtenido con glucosa debido al empalme con sulfato de amonio.

## CONCLUSIONES

- A pesar de que se obtuvo producción de  $\text{H}_2$ , los niveles máximos se observaron solo en un corto periodo de tiempo, a la vez que se obtuvo menor producción total en ml respecto a la cepa WDHL.
- El tiempo de latencia (sin producción) se alargó más de lo observado con anterioridad, resultando en una producción con bajos rendimientos debido a los periodos largos de producción.
- Estos resultados sugieren que debido al descenso en el pH, el cual no fue controlado, provocó la baja y lenta producción durante la fermentación.
- A pesar de la baja producción obtenida, esta fue mayor en el experimento con extracto de levadura en comparación a los controles con lo cual se recomienda como fuente enriquecedora para aumentar la producción de  $\text{H}_2$ .

Vo. Bo. Investigador Titular C Dr. Antonio De Leon Rodríguez \_\_\_\_\_

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- E. Logan,<sup>\*,‡</sup> Sang-Eun Oh,<sup>‡</sup> In S. Kim,<sup>‡</sup> and Steven Van Ginkel<sup>‡</sup>. **Biological Hydrogen Production Measured in Batch Anaerobic Respirometers.** *Environ. Sci. Technol.*, **2002**, 36 (11), pp 2530–2535
- Gustavo Davila-Vazquez Æ Sonia Arriaga Æ Felipe Alatríste-Mondragón Æ Antonio de Leon-Rodríguez Æ Luis Manuel Rosales-Colunga Æ Eli'as Razo-Flores. **Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives** División de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. 2007
- Kaushik Nath . Debabrata Das. **Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches.** *Appl Microbiol Biotechnol* (2004) . 520–529
- Sawers R.G **Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*** Department of Molecular Microbiology, John Innes Centre, Norwich NR4 7UH, U.K. *Biochemical Society Transactions* (2005) Volume 33, part 1.
- Zhanmin Fan,<sup>1</sup> Ling Yuan,<sup>1</sup> and Ranjini Chatterjee<sup>2</sup> **Increased Hydrogen Production by Genetic Engineering of *Escherichia coli*.** November 24, 2008.

