

# MÉTODOS DE BIOPRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

Julia S. Martín del Campo, Rodrigo Patiño\*

\* Cinvestav – Unidad Mérida, Departamento de Física Aplicada.  
Mérida, Yucatán, México.

\*Tel: +(999)9429438, Fax: +(999)9812917, Correo-e: rtarkus@mda.cinvestav.mx

## RESUMEN

La energía solar es la fuente disponible más abundante y accesible para la producción sostenible de combustibles y electricidad. La conversión directa de luz solar en sustancias químicas combustibles es una vía prometedora para la obtención de energía no dependiente de los combustibles fósiles. La fotosíntesis es la fuerza motora fundamental que soporta todos los procesos sintéticos de los biocombustibles, convirtiendo la energía solar en biomasa, almacenando productos de carbono (*e.g.*, carbohidratos y lípidos) o liberando hidrógeno molecular ( $H_2$ ). En este trabajo se presenta una revisión bibliográfica sobre los distintos métodos que existen en la literatura para la bioproducción de hidrógeno. Estos métodos incluyen la manipulación de microalgas, cianobacterias, bacterias y sistemas multienzimáticos.

## 1.- Introducción

Los flujos de energía que observamos en el planeta Tierra tienen su origen primario en el Sol. A su vez, la energía proveniente del Sol y de las demás estrellas del Universo proviene de reacciones de fisión nuclear que transforman los núcleos de hidrógeno en núcleos de helio y de otros más pesados. La formación de la Tierra hace millones de años le hizo incluir de manera inherente una energía que tiene su origen en el Sol y que todavía conserva nuestro planeta: las energías de traslación y de rotación, así como la energía geotérmica que prevalece en el centro de la Tierra y la radiación solar que constantemente incide sobre su superficie. La energía de traslación da origen a las estaciones del año, la energía de rotación da origen a los días y las noches, la energía geotérmica da origen a los movimientos tectónicos. Todos estos fenómenos, junto con la continua radiación solar, son responsables también de las corrientes marinas y los

vientos, así como del fenómeno de la vida en nuestro planeta. A pesar de sus enormes y continuas transformaciones nucleares, hay indicios de que el Sol ha sido y seguirá siendo estable por miles de millones de años, por lo que entonces se le puede considerar una fuente renovable de energía [1].

A lo largo de las últimas décadas, el modelo energético del mundo se ha basado de manera primordial en los combustibles fósiles: el petróleo, el carbón mineral y el gas natural. Estos materiales son también consecuencia indirecta de la energía solar tomada por la Tierra, pero las velocidades de conversión a energía tienen varios órdenes de magnitud mayores a las velocidades de formación de los combustibles. Esto genera una preocupación por el agotamiento inevitable de las reservas y por los efectos de contaminación ambiental que están dando origen al cambio climático global. Los biocombustibles surgen entonces como una alternativa atractiva por sus características de renovabilidad e integración de ciclos [2].

El hidrógeno destaca entre todos los combustibles alternativos porque es el único que no incluye carbono en su composición, lo que lo hace medioambientalmente limpio durante su combustión. Además, aunque no se encuentra de manera libre en la naturaleza, se le puede extraer del agua, un recurso abundante en nuestro planeta. El hidrógeno es un gas que se puede aprovechar de manera versátil para su conversión a energía térmica, mecánica o eléctrica, pero también se visualiza como la materia prima para la fisión nuclear en un proceso controlado de producción energética que emula al de las estrellas como el Sol [3].

De la variedad de combustibles conocidos, el hidrógeno tiene el mayor contenido de energía por unidad de masa. Desafortunadamente, los métodos comerciales existentes actualmente (electrólisis del agua, gasificación y reformado termocatalítico de compuestos ricos en hidrógeno), usualmente requieren altas entradas de energía provenientes de fuentes no renovables. La producción biológica de hidrógeno evade este problema empleando microorganismos para convertir la biomasa o la energía solar en gas hidrógeno bajo condiciones suaves de presión y temperatura [4].

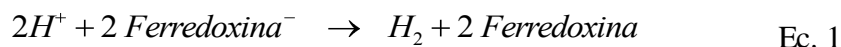
La producción de hidrógeno por microalgas verdes es un proceso dependiente de luz [5] en el que las hidrogenasas, que son las enzimas que catalizan la reacción de reducción de protones ( $H^+$ ) a  $H_2$  [6], están acopladas *vía* ferredoxina a la cadena de transporte de

electrones fotosintética. Las cianobacterias también son capaces de producir hidrógeno por acción de enzimas hidrogenasas, pero en un proceso acoplado a la fijación de nitrógeno [7]. Otras bacterias liberan hidrógeno durante procesos fermentativos de desechos orgánicos. Finalmente, basados en los complejos procesos metabólicos mencionados anteriormente, se han desarrollado rutas sintéticas *in vitro* para la producción de H<sub>2</sub> [8]. En estos sistemas multienzimáticos, la hidrogenasa juega siempre el papel primordial del proceso. Esta propuesta resulta prometedora en términos de control y eficiencia sobre los sistemas microbiológicos, pero rescatando las ventajas de la biocatálisis.

## 2.- Fotosíntesis oxigénica y anoxigénica

La fotosíntesis involucra una serie de pasos: (i) absorción de luz, (ii) separación de carga y rompimiento de la molécula de agua, (iii) transporte de electrones, (iv) reducción del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado (NADP<sub>ox</sub>) y (v) generación de un gradiente de protones para la síntesis de adenosín trifosfato (ATP). Este proceso se lleva a cabo en las membranas tilacoides de los cloroplastos (Figura 1) y comienza con la absorción de luz por los pigmentos fotosintéticos (clorofilas, ficobilinas y carotenoides), que están asociados con los complejos proteicos: fotosistema I (FSI) y fotosistema II (FSII). La energía de la luz absorbida es transferida a los centros de reacción del FSII donde ocurre la separación de carga [7]. Los electrones son transferidos del FSII al FSI y a la ferredoxina. Normalmente, la ferredoxina transfiere los electrones a la enzima ferredoxina-NADP-reductasa que reduce NADP<sub>ox</sub> a NADP<sub>red</sub>, una fuente de electrones muy importante (fotosíntesis oxigénica), necesaria para convertir el CO<sub>2</sub> en carbohidratos en el ciclo de Calvin-Benson.

Bajo condiciones de anaerobiosis, algunas microalgas verdes y cianobacterias producen hidrógeno [10]: la hidrogenasa puede aceptar los electrones de la ferredoxina reducida y usarlos para reducir protones (H<sup>+</sup>) a hidrógeno molecular H<sub>2</sub> (Ec. 1).



Entonces, el poder reductor fotosintético puede aprovecharse en al menos dos rutas metabólicas: reducción de CO<sub>2</sub> o producción de hidrógeno (Figura 1). La reducción de

CO<sub>2</sub> requiere una ruta de ATP para usar los agentes reductores del agua, mientras que la producción de H<sub>2</sub> no emplea ATP [9].

Las microalgas verdes producen hidrógeno a una tasa mayor que las cianobacterias debido a que las hidrogenasas de las microalgas son de la clase [FeFe]-hidrogenasa que son mas específicas que las [NiFe]-hidrogenasas de las cianobacterias [9]. La actividad de ambos tipos de hidrogenasas y su transcripción se ven fuertemente inhibidas por la presencia de O<sub>2</sub> [7, 11, 12]. Para que el hidrógeno sea producido de manera continua (resguardando la expresión y actividad de la hidrogenasa) hay que igualar la velocidad de fijación de O<sub>2</sub> a su tasa de producción por fotosíntesis [10]. Se ha propuesto un protocolo experimental basado en la limitación de azufre que permite la producción prolongada de hidrógeno por microalgas. Al limitar la fuente de azufre se originan dos etapas: durante la primera, la fotosíntesis oxigénica es la dominante, con la consecuente producción de biomasa por acción del ciclo de Calvin-Benson, y durante la segunda se inicia la etapa anoxigénica, en la cual se induce la expresión de la hidrogenasa y comienza la producción de hidrógeno [13].

La microalga *Chlamydomonas reinhardtii* posee una [FeFe]-hidrogenasa siendo un microorganismo modelo para la bioproducción de H<sub>2</sub> [14]. Hasta el momento se ha reportado que *C. reinhardtii* tiene la producción de H<sub>2</sub> mas alta de los microorganismo estudiados (241 mL de H<sub>2</sub> por litro de cultivo en 160 h), además de ser el microorganismo productor de H<sub>2</sub> mas conocido [10]. Para que *C. reinhardtii* comience a producir hidrógeno induciendo la anaerobiosis por ausencia de azufre [15], es necesario lavar la biomasa; para ello, el cultivo es centrifugado, se desecha el sobrenadante y la pastilla se resuspende en medio TAP [16] libre de azufre, para nuevamente centrifugar y resuspender las células en TAP sin azufre. Existen diferentes criterios acerca de cuántos lavados se deben hacer, sin embargo, debe tenerse en cuenta que cada paso de centrifugación afecta la integridad celular [11]. Una forma alternativa para inducir la anaerobiosis por falta de azufre es inocular en un medio con pequeñas cantidades del mismo [17]. Para la producción de H<sub>2</sub> en ausencia de azufre, la presencia de acetato es esencial para establecer la anaerobiosis [18]. Debido a la gran variación de las respuestas metabólicas de *C. reinhardtii* en cultivos sin azufre, es recomendable que cada

laboratorio ensaye las diferentes variables involucradas en la producción de hidrógeno [11].

Para que el proceso de producción de hidrógeno por *C. reinhardtii* en condiciones no controladas (e.g. al exterior), pueda competir con los combustibles fósiles y ser económicamente viable, debe tener una eficiencia mínima del 7%. Aunque se tienen eficiencias teóricas máximas entre 10 y 16%, hasta el momento sólo se han alcanzado eficiencias de sólo el 1.5% en condiciones controladas de laboratorio [14].

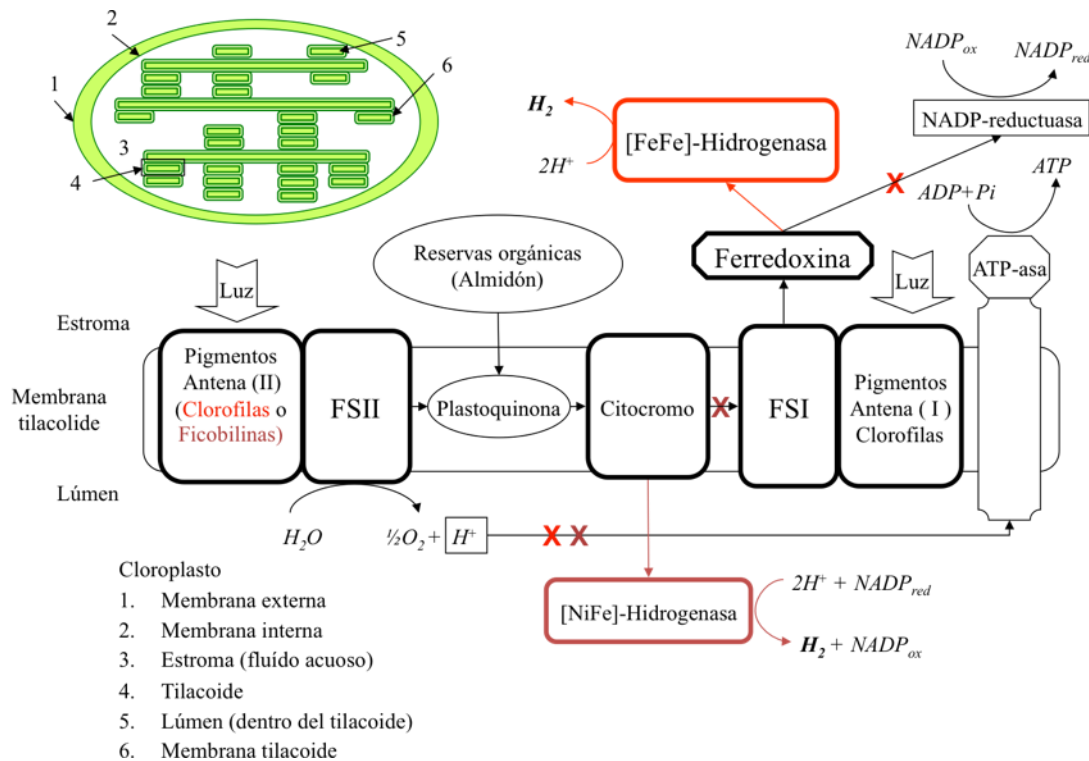


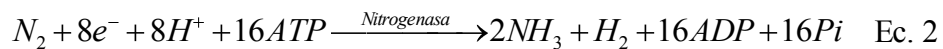
Figura 1. Fotoproducción de hidrógeno por microalgas verdes (rojo) y cianobacterias (azul). Tanto en las microalgas como en las cianobacterias, la producción de  $H_2$  se lleva a cabo en los cloroplastos donde se encuentra el aparato fotosintético y en ambos casos se inhibe la producción de ATP. En microalgas verdes, la reducción de los protones  $H^+$  a  $H_2$  no requiere de  $NADP_{red}$ .

### 3.- Fotofermentación

Las bacterias fotosintéticas (cianobacterias, e.g. *Rhodospirillum rubrum*) pueden crecer anaeróbicamente y producir hidrógeno por dos mecanismos diferentes: fijación de nitrógeno  $N_2$  y fotosíntesis anoxigénica [19]. Las cianobacterias son bacterias fijadoras de nitrógeno que viven en simbiosis con ciertas plantas verdes, especialmente con las leguminosas, y proporcionan cerca de la mitad del nitrógeno necesario para el cultivo.

Las cianobacterias realizan la fotosíntesis oxigénica empleando la misma ruta metabólica de transporte de electrones de las microalgas; diversas cepas de cianobacterias fijadoras y no fijadoras de nitrógeno tienen una [NiFe]-hidrogenasa bidireccional que puede producir y consumir hidrógeno, en función del potencial redox intracelular. Bajo condiciones de anaerobiosis, la enzima hidrogenasa cataliza la producción de hidrógeno empleando el  $\text{NADP}_{\text{red}}$  foto-reducido como donador de electrones (Figura 1). Las [NiFe]-hidrogenasas son en general más tolerantes al oxígeno que las [FeFe]-hidrogenasas de las microalgas y su inactivación por  $\text{O}_2$  es reversible, a diferencia de las [FeFe]-hidrogenasas cuya inactivación es irreversible. Al igual que en las microalgas verdes, en las cianobacterias los electrones para producir  $\text{H}_2$  son originados por la ruptura de agua durante la fotosíntesis [7].

Otro mecanismo mediante el cual las cianobacterias producen  $\text{H}_2$  es la fijación de nitrógeno. En este proceso, la reducción de  $\text{N}_2$  a  $\text{NH}_3$  catalizada por la enzima nitrogenasa, está acompañada por la producción de  $\text{H}_2$  molecular (Ec. 2). Los electrones empleados por la nitrogenasa para reducir el  $\text{N}_2$  son transportados *vía* ferredoxina del FSI, empleando energía en forma de ATP generado por la asimilación de compuestos orgánicos[20].

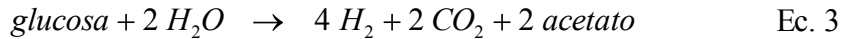


La nitrogenasa es una enzima compuesta por dos unidades, una [MoFe]-proteína o dinitrogenasa y una [Fe]-proteína o dinitrogenasa reductasa. En la [MoFe]-proteína se unen los sustratos ( $\text{N}_2$ ,  $\text{H}^+$  y ATP) y en la [Fe]-proteína se ensambla la ferredoxina para transferir los electrones y reducir el  $\text{H}_2$  [7].

#### **4.- Sistemas integrados para la producción de $\text{H}_2$ : fotólisis-fotofermentación-fermentación**

La biodegradación de materia orgánica en ausencia de oxígeno es llamada fermentación. El hidrógeno puede ser producido por bacterias anaerobias en ausencia de luz y con sustratos ricos en carbohidratos (*e.g.* *Clostridium pasteurianum*) a una velocidad de 25-55 mL de  $\text{H}_2$  por litro de cultivo por hora [19, 20]. El  $\text{H}_2$  es uno de los productos finales del metabolismo del piruvato formado durante el catabolismo de diversos sustratos (Ec. 3). Como subproducto se obtiene una diversidad de ácidos orgánicos simples como

malato, lactato, propionato, butirato o acetato, que son acumulados en el medio y limitan el rendimiento de  $H_2$ , por lo que la duración de la etapa productiva es muy corta [19].



Los productos secundarios de la fermentación pueden ser extraídos del medio de cultivo y empleados como fuente de carbono para el crecimiento de microalgas y bacterias fotosintéticas [19]. Los sistemas integrados captan la radiación solar de manera mas eficiente, debido a que los espectros de absorción de las microalgas verdes (400-600 nm) y de las cianobacterias (800-1100 nm) son complementarios [7, 19]. En este sistema aún en estudio, el papel del fotobiorreactor es producir  $H_2$  mediante fotosíntesis oxigénica y no oxigénica, así como acumular biomasa celular. La biomasa producida es empleada como sustrato en el proceso de fermentación oscura para la producción microbiológica de  $H_2$  y  $CO_2$ ; a su vez, el dióxido de carbono es recirculado a los fotobiorreactores junto con los ácidos orgánicos producidos (Figura 2), para estimular la producción de biomasa algal [7, 19].

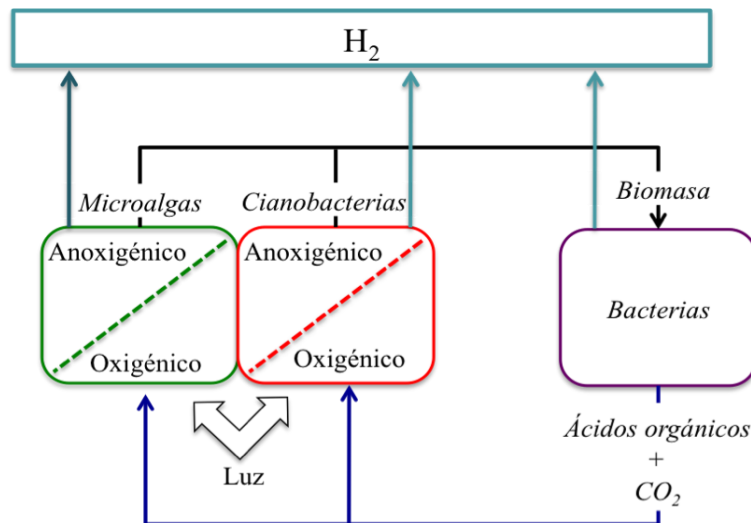


Figura 2. Sistema integrado para la producción biológica de hidrógeno.

## 5.- Producción enzimática de hidrógeno *in vitro*

Se ha mostrado que es posible la producción de hidrógeno a partir de celulosa, empleando una mezcla de celulasas para generar glucosa que es transformada por la enzima glucosa deshidrogenasa en ácido glucónico. Para ello se requiere de la coenzima  $NADP_{ox}$  que acepta dos electrones de la glucosa para reducirse; posteriormente, en una

inusual reacción catalizada por una hidrogenasa, el  $\text{NADP}_{\text{red}}$  se oxida para reducir los protones  $\text{H}^+$  y producir  $\text{H}_2$ . Esta hidrogenasa es aislada del microorganismo extremófilo *Pyrococcus furiosus* que se encuentra en los fondos marinos [21].

Otra propuesta para la producción de hidrógeno a partir de material celulósico se basa en el ciclo de las pentosas fosfato y puede resumirse en cinco etapas: (i) Conversión de la celobiosa en glucosa-1-fosfato (g1f) catalizada por la enzima celobiosa fosforilasa; (ii) generación de glucosa-6-fosfato (g6f) a partir de g1f catalizada por la fosfoglucomutasa; (iii) producción catalizada de  $\text{NADP}_{\text{red}}$  por las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, de la fase oxidativa del ciclo de las pentosas fosfato; (iv) regeneración de la g6f a partir de la ribulosa-5-fosfato, catalizada por la fase no oxidativa del ciclo de las pentosas fosfato; (v) generación de  $\text{H}_2$  a partir de  $\text{NADP}_{\text{red}}$  por acción de la hidrogenasa de *P. furiosus* [8].

También se están estudiando sistemas que emplean luz solar para la producción de  $\text{H}_2$  y consisten de una [NiFeSe]-hidrogenasa de *Desulfomicrobium baculatum* y un fotosensibilizador de rutenio en una solución coloidal de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ . En este sistema, la luz solar excita al fotosensibilizador, el cual libera electrones que se transportan a la banda de conducción del  $\text{TiO}_2$  para después ser transferidos a la hidrogenasa a través de una serie de cúmulos de FeS unidos a la superficie de la enzima hasta el sitio activo en donde los protones provenientes de la solución acuosa son reducidos a  $\text{H}_2$  [22].

## 6.- Conclusiones

Existen numerosos procesos de origen biológico para la producción de hidrógeno molecular; con excepción de la fermentación, todos ellos involucran la acción de una enzima hidrogenasa. Debido a que los bioprocesos no requieren de condiciones extremas de temperatura o presión, muchos de ellos se llevan a cabo en condiciones ambientales, lo que reduce de manera importante los riesgos de operación así como el consumo de energía. El flujo neto de carbono es cero cuando estos sistemas involucran organismos fotosintéticos, como las microalgas y las cianobacterias.

Los procesos que integran organismos fermentativos y fotosintéticos parecen tener muchas ventajas sobre los sistemas que involucran sólo una especie, como el



aprovechamiento de mayores intervalos de radiación y el intercambio de nutrientes. Su complejidad los hace más eficientes pero también más vulnerables y aún difíciles de operar. Finalmente, los sistemas multienzimáticos no involucran la manipulación de seres vivos, por lo que parecen más atractivos en la operación, pero hay que considerar los costos asociados con la extracción y manipulación de enzimas.

Aún se requieren muchos estudios para la bioproducción de hidrógeno mediante procesos escalables en términos económicos y mediante el uso de energías renovables como la radiación solar. La comprensión, la reproducibilidad y el mejoramiento de las eficiencias de estos bioprocesos es todavía un reto que no debe dejarse de lado.

## **7.- Referencias**

- [1] B. Sorensen, Renewable energy: its physics, engineering, use, environmental impacts, economy and planning aspects. ed. 3, Elsevier, Estados Unidos, 2004.
- [2] R. A. Hinrichs and M. Kleinbach, Energy: its use and the environment. ed. 4, Thomson, 2006.
- [3] B. Sorensen, Hydrogen and fuel cells: emerging technologies and applications. ed. Elsevier, Estados Unidos, 2005.
- [4] J. Mathews and G. Wang, Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy 34 (2009) 7404-7416.
- [5] H. Gaffron and J. Rubin, Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. Journal of General Physiology 26 (1942) 219-240.
- [6] M. Stephenson and L. H. Stickland, Hydrogenase: A bacterial enzyme activating molecular hydrogen. Biochemical Journal 25 (1931) 205-214.
- [7] M. L. Ghirardi, A. Dubini, J. Yun, and P. Maness, Photobiological hydrogen-producing systems. Chemical Society Reviews 38 (2009) 52-61.
- [8] X. Ye, Y. Wang, R. C. Hopkins, M. W. Adams, V. R. Evans, J. R. Mielenz, and Y.-H. P. Zhang, Spontaneous High-Yield Production of Hydrogen from Cellulosic

Materials and Water Catalyzed by Enzyme Cocktails. *ChemSusChem* 2 (2009) 149-152.

- [9] S. I. Allankhverdiev, V. D. Kreslavski, V. Thavasi, S. K. Zharmukhamedov, V. V. Klimov, T. Nagata, H. Nishihara, and S. Ramakrishna, Hydrogen photoproduction by use photosynthetic organisms and biomimetic systems. *Photochemical & Photobiological Sciences* 8 (2009) 148-156.
- [10] T. Matthew, S. R. Thomas-Hall, A. Darling, E. Zhang, B. Hankamer, U. C. Marx, and P. M. Schenk, Phylogenetic and molecular analysis of hydrogen-producing green algae. *Journal of Experimental Botany* 60 (2009) 1691-1702.
- [11] A. Hemschemeier, A. Melis, and T. Happe, Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. *Photosynthesis Research* 102 (2009) 523-540.
- [12] S. T. Stripp and T. Happe, How algae produce hydrogen-news from the photosynthetic hydrogenase. *Dalton Transactions* (2009) 9960-9969.
- [13] V. Chochois, D. Dauvillée, A. Beyly, D. Tolleter, S. Cuine, H. Timpano, S. Ball, L. Cournac, and G. Peltier, Hydrogen Production in *Chlamydomonas*: Photosystem II-Dependent and -Independent Pathways Differ in Their Requirements for Starch Metabolism. *Plant Physiology* 151 (2009) 631-640.
- [14] J. Rupprecht, From systems biology to fuel-*Chlamydomonas reinhardtii* as a model for a systems biology approach to improve biohydrogen production. *Journal of Biotechnology* 142 (2009) 10-20.
- [15] L. Giannelli, A. Scoma, and G. Torzillo, Interplay Between Light Intensity, Chlorophyll Concentration and Culture Mixing on the Hydrogen Production in Sulfur-Deprived *Chlamydomonas reinhardtii* Cultures Grown in Laboratory Photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 104 (2009) 76-90.
- [16] *Chlamydomonas Center*. Recipes for commonly used culture media Database: 2008- 2010. Disponible en: [www.chlamy.org](http://www.chlamy.org).

- [17] L. P. Zhang, T. Happe, and A. Melis, Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H<sub>2</sub>-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta* 214 (2002) 552-561.
- [18] S. Fouchard, A. Hemschemeier, A. Caruana, J. Pruvost, J. Legrand, T. Happe, G. Peltier, and L. Cournac, Autotrophic and Mixotrophic Hydrogen Photoproduction in Sulfur-Deprived *Chlamydomonas* Cells. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2005) 6199-6205.
- [19] A. Melis and M. R. Melnicki, Integrated biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 31 (2006) 1563-1573.
- [20] S. Manish and R. Banerjee, Comparison of biohydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 33 (2008) 279-286.
- [21] N. Hershlag, I. Hurley, and J. Woodward, A simple Method To Demonstrate the enzymatic Production of Hydrogen from Sugar. *Journal of Chemical Education* 75 (1998) 1270-1274.
- [22] E. Reisner, D. J. Powell, C. Cavazza, J. C. Fotevilla-Camps, and F. A. Armstrong, Visible Light-Driven H<sub>2</sub> Production by Hydrogenases Attached to Dye-Sensitized TiO<sub>2</sub> Nanoparticles. *Journal American Chemical Society* 131 (2009) 18457-18466.