

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS

**BIO-CONVERSIÓN MICROBIANA DEL GLICEROL POR
MICROORGANISMOS TERMOTOLERANTES AISLADOS DEL
NORESTE DE MÉXICO**

**POR
I.I.A. LEONEL IGNACIO BLANCO DE LA CRUZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA APLICADA**

DICIEMBRE, 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



BIO-CONVERSIÓN MICROBIANA DEL GLICEROL POR
MICROORGANISMOS TERMOTOLERANTES AISLADOS DEL NORESTE
DE MÉXICO

Por:

I.I.A. LEONEL IGNACIO BLANCO DE LA CRUZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN
CIENCIAS con orientación en Microbiología Aplicada

MONTERREY, N.L.

DICIEMBRE, 2016

**“BIO-CONVERSIÓN MICROBIANA DEL GLICEROL POR
MICROORGANISMOS TERMOTOLERANTES AISLADOS DEL NORESTE
DE MÉXICO”**

Aprobación de la tesis:

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez

Presidente

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

Secretario

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño

Vocal

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez

Sub-Directora de Estudios de Posgrado

2014-2016

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de antemano de la manera más atenta al Dr. Edgar Allan Blanco Gámez asesor de tesis, por darme la oportunidad para realizar este posgrado. Al Dr. José Rubén Morones Ramírez por su participación como co-asesor de tesis, Así como a todos los que formaron parte del comité tutorial, la Dra. María Teresa Garza González, Dr. Xristo Zárate Kalfópulos y al Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño por sus valiosas aportaciones e interés para la realización del presente trabajo.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante el periodo académico para la realización del presente trabajo.

A la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ), de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por brindarme la oportunidad de realizar el posgrado en sus instalaciones y prepararme académicamente con el grado de Maestro en Ciencias.

Al Centro de Laboratorios Especializados de la Facultad de Ciencias Químicas (CELAES) por la utilización de sus instalaciones, y a todos los que forman parte del equipo del Dr. Allan, en especial a Luis Roberto Galindo, Giselle Treviño por todo su apoyo en el laboratorio para la realización de este trabajo

A la Dra. María Elena Cantú Cárdenas por todo su apoyo brindado durante todo este tiempo.

Al MC Albert Isaac Lerma y al QFB Augusto Vázquez del equipo del Laboratorio de Biotecnología 3 de la Facultad de Ciencias Químicas por todo su apoyo para la realización de este trabajo.

A la M.C. Adriana Liñan por el apoyo otorgado y a su equipo de trabajo la Dra. Gloria Dimas y al M.C. Elías Silva.

Al M.C. Mariano Francisco Candelario Torres por los momentos en lo que siempre estuvo disponible, por haber hecho posible la realización del presente trabajo.

Al QFB Jorge Hernández Fernández por el apoyo otorgado.

A mis compañeros de generación de posgrado: Javier Garza, Luis Ávila, Melissa Suarez, Sugey, Claudia Barahona y a Anahí por todos los momentos que pasamos juntos y todo el apoyo durante el presente trabajo

A todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

Primeramente, agradecer a Dios por darme la dicha de ilustrar mi vida dándome la fortaleza y sabiduría guiándome en esta nueva etapa de mi vida poniendo las personas indicadas en mi camino.

A mi padre **Alfonso Blanco Álvarez** que me impulso y brindo todo su apoyo incondicional hasta el último instante de su vida, para que pudiera continuar con mi preparación profesional.

A mi madre **María Aurora de la Cruz Ávila** por siempre estar ahí en cada momento fortaleciendo mi vida.

A toda mi familia por el apoyo moral que siempre me ha brindado

Y en especial a mi esposa **Jovita Hernández Gómez** y mis Hijos **Trinidad Leonel Blanco Hernández, Fátima Lizeth Blanco Hernández** y **Alfonso Blanco Hernández** por todo su apoyo y comprensión durante todo este tiempo.

RESUMEN

Nombre: I.I.A. Leonel Ignacio Blanco de la Cruz Fecha de graduación: Junio, 2016

Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Químicas

“BIO-CONVERSIÓN MICROBIANA DEL GLICEROL POR MICOORGANISMOS TERMOTOLERANTES AISLADOS DEL NORESTE DE MÉXICO”

Número de páginas

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología Aplicada.

Área de Estudio: Microbiología Ambiental Aplicada

Propósito y Método de Estudio: Utilizar el glicerol considerado como un producto secundario durante la producción del biodiesel, para generar productos con alto valor agregado, mediante la utilización de cepas termotolerantes capaces de llevar a cabo su oxidación a temperaturas elevadas. Actualmente existe una gran cantidad de este subproducto gracias al incremento que han tenido las biorefinerías. Para la obtención de estas cepas se realizó un muestreo en aguas termales de la comunidad de Espinazo NL. Obteniendo 2 cepas de las 14 muestras recolectadas, que crecieron a una temperatura de 60°C. Siendo de gran interés para fermentación que tiene como objetivo utilizar una temperatura de 50°C y llevar a cabo la oxidación del glicerol.

Conclusiones y contribuciones: Se logró aislar de aguas termales una cepa que demostró la capacidad de oxidar el glicerol a temperaturas de 50°C y producir Dihidroxiacetona (DHA) durante la fermentación, el producto se identificó por medio de espectrofotometría infrarroja y se logró su cuantificación a través de la utilización de un agente cromogénico. Por otro lado, las cepas se lograron identificar por técnicas moleculares con la amplificación de la secuencia del gen 16s rARN las secuencias se analizaron mediante el programa BLAST donde se comprobó que pertenecen al género *Bacillus licheniformis*, estas bacterias tienen la capacidad de producir enzimas como proteasas y amilasas con gran actividad a temperaturas de 65°C a 70°C que son de gran interés en la industria para la producción de detergentes.

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS USADOS

AG	Ácido glicérico
DHA	Dihidroxiacetona
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PET	Poliextremotolerante
2,4-DNFH	Dinitrofenilhidrazina
RCG	Reactivo cromogénico
pH	Potencial hidrógeno
GYC	Medio selectivo

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
1.1 Producción de Biodiesel.....	1
1.2 Glicerol como producto secundario.....	2
1.3 Características del glicerol.....	4
1.4 Conversión de glicerol.....	4
1.5 Oxidación química.....	5
1.6 Oxidación biotecnológica.....	8
1.7 Bacterias acéticas.....	10
1.8 Microorganismos termotolerantes.....	10
1.9 Enzimas termoestables.....	11
2 JUSTIFICACION.....	13
2.1 Justificación.....	13
3 HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	15
3.1 Hipótesis.....	15
3.2 Objetivo general.....	15
3.3 Objetivos específicos.....	16
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1 Material biológico.....	17
4.2 Material químico.....	18
4.3 Equipo de laboratorio.....	19

4.4 Muestreo microbiológico de bacterias termotolerantes.....	20
4.5 Muestreo de bacterias acéticas.....	21
4.6 Aislamiento de microorganismos.....	22
4.7 Crecimiento de las muestras termotolerantes recolectadas.....	23
4.8 Crecimiento de cepas termotolerantes en medio mínimo.....	24
4.9 Crecimiento de bacterias acéticas.....	25
4.10 Crecimiento de bacterias acéticas sobre etanol.....	26
4.11 Prueba de crecimiento a diferentes temperaturas en cepas recolectadas.....	26
4.12 Conservación de cepas recolectadas.....	27
4.13 Curva de crecimiento en cepas termotolerantes aisladas.....	28
4.14 Curva de crecimiento a diferentes temperaturas a cepas termotolerantes aisladas.....	28
4.15 Proceso de Oxidación.....	29
4.16 Comprobación de la oxidación con cepas ESP 01 A y ESP 01 F.....	29
4.17 Oxidación del glicerol con bacterias acéticas.....	30
4.18 Comprobación de la oxidación con bacterias acéticas.....	31
4.19 Método de purificación.....	31
4.20 Curva de calibración patrón DHA.....	31
4.21 Cuantificación de la DHA.....	32
4.22 Pruebas bioquímicas.....	32
4.23 Identificación molecular.....	33
5 RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	35
5.1 Aislamiento de cepas termotolerantes recolectadas.....	35
5.2 Aislamiento de bacterias acéticas.....	36
5.3 Crecimiento de las bacterias presentes en las muestras de aguas termales.....	38
5.4 Crecimiento en medio mínimo.....	38
5.5 Crecimiento de bacterias acéticas.....	39

5.6 Crecimiento de bacterias acéticas sobre etanol.....	39
5.7 Proceso de crecimiento a diferentes temperaturas en cepas recolectadas	40
5.8 Conservación de cepas aisladas.....	41
5.9 Curva de crecimiento en cepas aisladas.....	41
5.10 Curva de crecimiento a diferentes temperaturas.....	42
5.11 Proceso de oxidación con cepas termotolerantes aisladas.....	44
5.12 Comprobación de la oxidación por bacterias termotolerantes.....	45
5.13 Comprobación de la oxidación con bacterias acéticas.....	47
5.14 Comprobación de la presencia de la DHA por Cromatografía en Capa Fina	48
5.15 Curva de calibración para la cuantificación de DHA.....	52
5.16 Cuantificación de la DHA.....	53
5.17 Pruebas bioquímicas en cepas ESP 01 A y ESP 01 F.....	57
5.18 Identificación molecular.....	58
5.19 Identificación a nivel especie.....	60
6 CONCLUSIONES.....	63
6.1 Conclusiones.....	63
7 PERSPECTIVAS.....	65
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Derivados del AG por oxidación química.....	6
2. Función y derivados del AG por oxidación biotecnológica.....	8
3. Aplicaciones y usos de la DHA.....	9
4. Aplicaciones industriales de enzimas termoestables.....	12
5. Identificación en muestras de aguas termales	20
6. Composición del medio PET	23
7. Composición medio mínimo c/glucosa	25
8. Composición medio mínimo c/glicerol.....	25
9. Medio selectivo para el crecimiento de bacterias acéticas.....	25
10. Composición del medio Frateur para el crecimiento en etanol.....	26
11. Resultado de las pruebas bioquímicas.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación química del proceso de transesterificación.....	2
2. Estructura química del glicerol.....	4
3. Obtención de ácido glicérico por oxidación química.....	6
4. Representación a de la oxidación química del glicerol en DHA.....	7
5. Ruta metabólica de bioconversión DHA y AG	9
6. Ubicación de la zona de muestreo.....	21
7. Coordenadas del mercado mesón estrella.....	22
8. Morfología microscópica de la bacteria clasificada como ESP01 A donde se observan bacilos cortos Gram positivo	35
9. Morfología microscópica de la bacteria clasificada como ESP01 F donde se observan bacilos cortos Gram positivo	36
10. Crecimiento de bacterias acéticas en medio selectivo GYC	36
11. Imagen que representa el crecimiento de bacterias acéticas contaminadas con levaduras	37
12. Bacterias acéticas después de la purificación en la se observan bacilos cortos Gram negativos	37
13. Imagen representando el halo claro formado por las bacterias acéticas Acet 1 halo izquierdo y Acet 2 halo derecho	39
14. Imagen representando el halo claro formado por las bacterias acéticas Acet 3 halo izquierdo y Acet 4 halo derecho.....	40
15. Gráfica de la curva de crecimiento a 30°C.....	42
16. Curva de crecimiento de la cepa ESP 01 A a diferentes temperaturas...43	
17. Curva de crecimiento de la cepa ESP 01 F a diferentes temperaturas...44	
18. Determinación de la cetona presente en el medio de fermentación donde se observa un precipitado de color naranja suspendido en el medio	46
19. Reacción de la 2,4-DNFH con la cetona presente por la oxidación.....	46

20. Representación de la oxidación del glicerol con bacterias acéticas.....	47
21. Cromatografía en Placa Fina del producto obtenido por las cepas.....	48
22. Imagen en la que se observa las fracciones obtenidas durante la purificación de la DHA en los viales 6 y 7.....	49
23. FTIR de la oxidación del glicerol con la cepa ESP 01 A. Intensidad de una banda presente entre el rango 1600-1720	50
24. FTIR de la oxidación del glicerol con la cepa ESP 01 F. Intensidad de una banda presente entre el rango 1600-1720	51
25. FTIR del glicerol utilizado como control	51
26. Espectro FT-IR representativo de un carbonilo	52
27. Curva de calibración DHA y ecuación de la recta	53
28. Producción de DHA con la cepa ESP 01 A con respecto al tiempo.....	56
29. Producción de DHA con la cepa ESP 01 F con respecto al tiempo	57
30. Comprobación del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa	59
31. Comprobación de la amplificación 16s rARN mediante electroforesis en gel de agarosa	60

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Producción de Biodiesel

Actualmente se están desarrollando nuevas formas y métodos para la contribución al cuidado del medio ambiente, con el fin de disminuir la contaminación de gases de efecto invernadero en el mundo, con esto se busca la disminución en la utilización de combustibles derivados del petróleo, implementando con ello la utilización de energía proveniente de fuentes naturales renovables que puedan sustituir estos combustibles. Se ha determinado que los ésteres metílicos de ácidos grasos muestran grandes aplicaciones potenciales como sustitutos del diésel, siendo denominado biodiesel (Vicente, Coteron, & Martinez, M., Aracil, 1998). Entre los principales problemas asociados a la manufactura de los biocombustibles se encuentra su alto costo de producción, problema que puede ser reducido si los subproductos de estos procesos se convierten en productos de alto valor agregado (Almeida, Fávaro, & Quirino, 2012). Otra desventaja es la gran acumulación del glicerol,(Black & Nair, 2013) subproducto generado por la producción del biodiesel que provocaría una disminución de precio en su adquisición y el cierre

de empresas productoras de glicerol. En lo anterior radica el gran interés en producir productos químicos a partir de estos subproductos (Z. C. Hu, Zheng, & Shen, 2011).

1.2.- Glicerol como producto secundario.

El glicerol es obtenido como un producto secundario generado durante la producción del biodiesel, específicamente en la reacción de transesterificación de los triglicéridos al reaccionar con un alcohol de cadena corta como el metanol en un medio con un catalizador base como el hidróxido de sodio (NaOH) produciendo ésteres alquílicos de ácidos grasos (figura.1) (Zapata, Martínez, Arenas, & Henao, 2007), siendo estos extraídos de las semillas oleaginosas y de las palmas aceiteras. Las semillas más utilizadas para la elaboración de este biocombustible por su alto contenido en triglicéridos son: la semilla de girasol, la colza y la soja (Vicente et al., 1998).

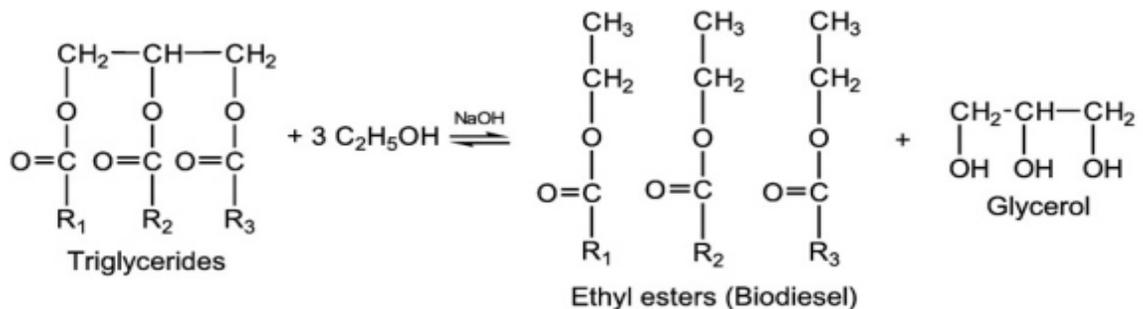


Fig. 1 Representación química del proceso de transesterificación (da Silva, Mack, & Contiero, 2009)

Otra forma de obtención más compleja y que a su vez contribuye con el cuidado del medio ambiente es a través de la reutilización de aceites usados en las empresas restauranteras. Aceites que requieren de un proceso más amplio por su alto contenido de residuos y humedad. Dichos aceites son sometidos a un proceso previo de filtración y esterificación para la obtención de los triglicéridos que finalmente son sometidos al proceso de transesterificación para la producción del biocombustible, proceso que se ha incrementado en los últimos años (Zhang, Dubé, McLean, & Kates, 2003).

A raíz del aumento en la producción del biodiesel, atribuido por el crecimiento paulatino de las biorefinerías que poco a poco se han extendido en diferentes países del mundo, se tiene como resultado un aumento considerable de glicerol, que está siendo utilizado como un producto secundario, atractivo y valioso para la obtención de productos químicos, los cuales puedan llegar a tener un alto valor agregado a la producción de estos biocombustibles (Habe, Shimada, *et al.*, 2009). Con esto se impulsa la utilización del glicerol y sus derivados en la producción del biodiesel quedando en un futuro como productos primarios, con los que se logre minimizar los costos de adquisición de biocombustibles promoviendo así su utilidad y contribuyendo con la disminución de contaminantes atmosféricos.

1.3.- Características del glicerol

El glicerol (1,2,3-Propanotriol) o glicerina como es comúnmente conocido con formula molecular ($C_3H_8O_3$), es un polialcohol (figura 2), perteneciente a la familia de alcoholes con tres grupos hidroxilos, es un líquido cristalino viscoso de sabor dulce, soluble en agua e insoluble en solventes, teniendo una densidad aproximada de 1.26 g/ml (Ferrero, Rosa, & Veneciano, 1994).

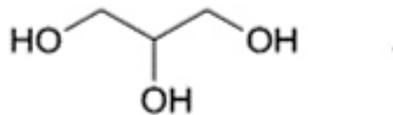


Figura 2. Estructura química del glicerol (Katryniok *et al.*, 2011)

El glicerol es utilizado para la fabricación de productos en las industrias química, farmacéutica, y alimenticia por sus propiedades como edulcorante, saborizante, humectante y conservante siendo metabolizado como un carbohidrato (Ferrero *et al.*, 1994).

1.4.- Conversión de glicerol.

La conversión del glicerol es realizado a través de la aplicación de métodos químicos y biotecnológicos con los que se logra la oxidación de los grupos hidroxilos, dando como resultado la obtención de productos químicos que son

de gran interés para diferentes industrias (Habe, Fukuoka, Kitamoto, & Sakaki, 2009b).

Ambos métodos se han estado explorando cada vez más en las últimas décadas con la finalidad de mejorar y optimizar los procesos, haciendo más selectiva la obtención de estos productos, actualmente se está estudiando la aplicación de catalizadores de Au, Pt y Pd, con los que se busca obtener resultados más específicos, que demuestren ser más eficiente en la selección de los productos químicos de interés (Sproge *et al.*, 2013).

1.5.- Oxidación química

La obtención de productos mediante la oxidación química (figura 3) está buscando la aplicación de catalizadores más específicos en cada uno de sus métodos ya que durante la oxidación de sustratos suelen desarrollarse subproductos no deseados haciendo más costosa su purificación (Sproge *et al.*, 2013). Actualmente se busca la oxidación dirigida hacia los grupos hidroxilo primarios logrando producir ácido glicérico (AG) (tabla 1). Mientras que de la oxidación de los grupos hidroxilos secundarios se logra la obtención de la dihidroxiacetona (DHA) figura 4, por otra parte al ser oxidados los tres grupos hidroxilos se obtiene ácido cetomalónico (o mesoxálico) (Schultz, de Souza, & Damaso, 2014).

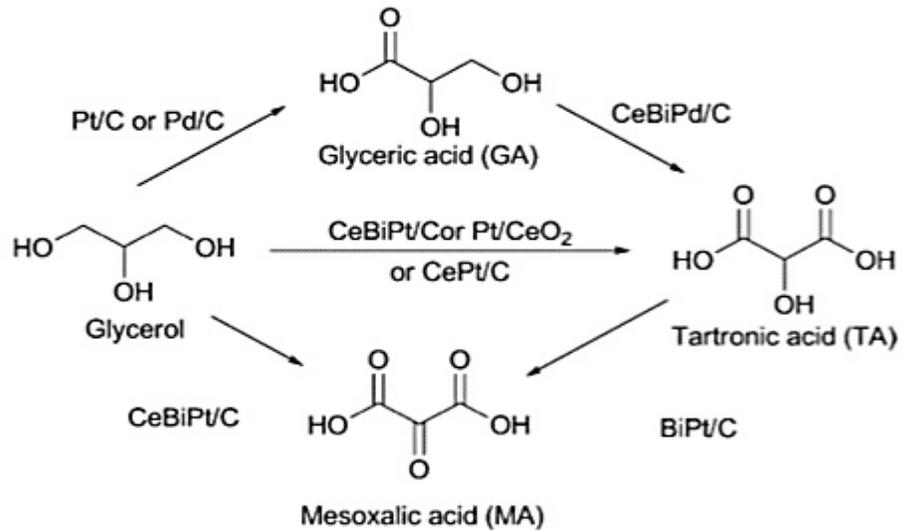


Figura 3. Obtención de ácido glicérico por oxidación química (Katryniok *et al.*, 2011)

Tabla 1. Derivados del AG por oxidación química (Habe, Fukuoka, Kitamoto, & Sakaki, 2009a)

Derivado de AG.	Función
Sal de amonio cuaternario a base de AG	Agentes acondicionadores de tejidos
Monoalquil glicerato	Surfactante
Fosfolípido basado-AG	Fosfolípido análogo
D-Glicerato sal monohidratada emicálcica	Aceleración de la oxidación etanol y acetaldehído

Estudios recientes demostraron que al utilizar nanopartículas de oro soportados sobre catalizadores ácido-base es posible obtener un porcentaje mayor de 1,3 dihidroxiacetona, ya que durante la oxidación de este producto es común que se obtenga un porcentaje de ácido glicérico durante la oxidación catalítica del glicerol (Yuan, Gao, & Xu, 2015).

Por ejemplo, la aplicación de una mezcla compleja de sales de sulfonato metales Mg-Al y una capa doble de hidróxido, en donde el Cu (III) y el Cu (II) de la mezcla intercalada promovieron la activación del H₂O₂ proporcionando una mayor oxigenación para la oxidación del glicerol en dihidroxiacetona (DHA) (Luo, Li, Zhao, Wang, & Xiao, 2015).

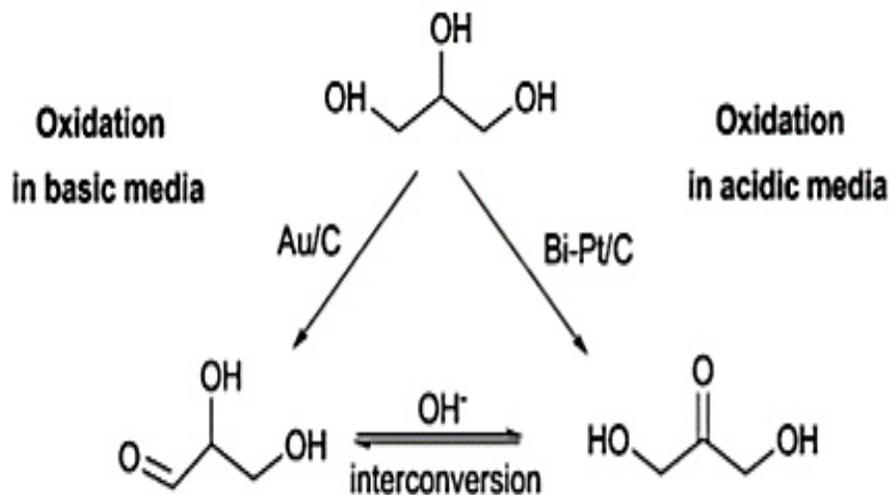


Figura 4. Representación de la oxidación química del glicerol en DHA (Katryniok *et al.*, 2011).

1.6.- Oxidación biotecnológica

Los investigadores día con día están en la constante búsqueda de microorganismos que tienen la capacidad de crecer en una gran diversidad de ambientes extremos, buscando la presencia de enzimas que puedan tener el potencial de ser sometidos a los procesos de bioconversión mostrando cualidades biocatalítica de oxidación más específicas con respecto a los procesos químicos (Demirjian, Morís-Varas, & Cassidy, 2001). Ejemplo de ello es la oxidación del glicerol (figura 5), proceso innovador para la bioconversión del sustratos en derivados químicos mediante la aplicación de microorganismos del género perteneciente a las *Acetobacterias*. Dentro de la obtención de productos se pueden mencionar el ácido glicérico (tabla 2) y la dihidroxiacetona (tabla 3) que son producidos por las bacterias bajo condiciones aerobias, y hasta ahora sólo se han determinado cepas como *Gluconobacter sp.*, *Acetobacter sp.*, y *Gluconacetobacter sp.* (Figura 5) las cuales han demostrado tener la capacidad de oxidar el glicerol para producir estos derivados (Sato *et al.*, 2013) (Z. Hu, Liu, & Zheng, 2010).

Tabla 2.-Función y derivados del AG por oxidación biotecnológica (Habe, Fukuoka, et al., 2009a).

Derivado de GA	Función
Ácido glicérico	Estimulante del hígado y de la actividad colestero litica
Dialquil glicerol.	actividad antitripsina

En la Tabla 3 se resumen algunas aplicaciones la DHA.

Tabla 3 Aplicaciones de la DHA (Stasiak-Rzaska, Bazejak, & Gientka, 2014)

Aplicación en la	Función
Industria	
Alimentos	Edulcorante en sustitución de la glucosa para productos dirigidos a personas con problemas diabéticos
Cosmética	Principal ingrediente activo en el cuidado de la piel en los productos de bronceado
Farmacéutica	Para la elaboración de fármacos, en medicina para el tratamiento de vitíligo y en otros de sus múltiples usos es utilizado contra la intoxicación con cianuro

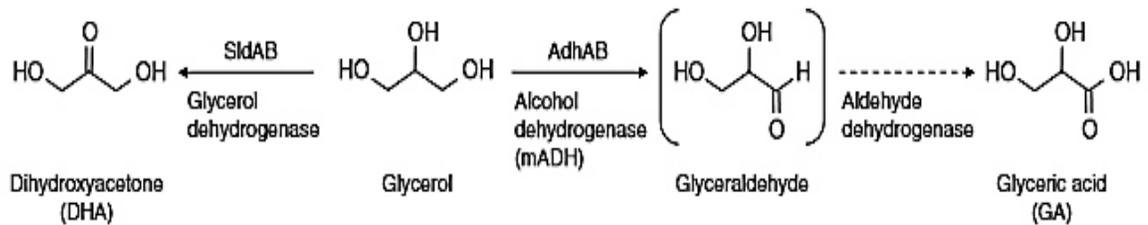


Figura. 5 Ruta metabólica de obtención DHA y AG por *Gluconobacter spp* (Sato *et al.*, 2013)

1.7.- Bacterias acéticas

Este tipo de bacterias generalmente son encontradas en frutos, jugos y vinagres, las bacterias utilizan estos azúcares y alcoholes que son oxidados de manera incompleta produciendo metabolitos de ácidos orgánicos que son excretados en el medio (Mas, Torija, García-parrilla, & Troncoso, 2014). Bacterias del ácido acético son aerobios obligados Gram negativos que muestran oxidación eficiente (Claret, Salmon, Romieu, & Bories, 1994) de una amplia gama de sustratos mediante numerosas enzimas deshidrogenasas y oxidoreductasas (Habe, Fukuoka, et al., 2009b). Estas enzimas se encuentran en la membrana celular realizando sus actividades en el espacio periplásmico con el centro activo hacia el exterior. De ahí que los metabolitos producidos por la oxidación parcial de los sustratos como azúcares y alcoholes utilizados en la fermentación siendo excretados hacia el exterior de la célula quedando disueltos en el medio transformados en productos como aldehídos y cetonas (Keliang & Dongzhi, 2006).

1.8.-Microorganismos termotolerantes

Los microorganismos están presentes en diferentes ambientes, por lo que existe una gran diversidad de bacterias que están en constante evolución, hoy en día existe un gran interés por descubrir nuevas cepas de microorganismos termotolerantes y termófilos con enzimas capaces de soportar procesos a elevadas temperaturas. Estas enzimas son de gran interés para la industria y el comercio con el objetivo de reducir costos y hacer más eficientes los métodos

de producción (Ibrahim, Zhu, Yusef, Isnaeni, & Limdheh Hong, 2013). Actualmente existe una nueva clasificación dentro de este grupo termófilos que crecen a una temperatura óptima de 45-70°C como lo son *Bacillus acidocaldarius* y *Bacillus stearothermophilus* (Fallis, 2013). Además existen microorganismos termófilos extremos como: *Pyrococcus furiosus*, *Thermotoga marítima*, *Sulfolobus solfataricus* que se encuentran en gran variedad de ambientes extremos en localidades termales, desiertos y regiones volcánicas que han sido de gran avance para la biotecnología (Frock & Kelly, 2012). Ejemplo más conocido de sus aplicaciones se encuentra la Taqpolimerasa de *Thermus aquaticus*, enzima que vino a revolucionar la biología molecular con la amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) mediante la utilización de la PCR, técnica que en la actualidad cuenta con un sin número de aplicaciones que van desde la identificación genética, hasta poder detectar virus y bacterias presentes en enfermedades genéticas del ser humano. Desde su descubrimiento se ha buscado la manera de mejorar y perfeccionar su uso (T. Chen & Romesberg, 2014)

1.9.-Enzimas termoestables

Las enzimas que han sido aisladas de estos microorganismos presentan características únicas, principalmente la capacidad de resistir y funcionar en ambientes con altas temperaturas, por lo que les permite ser utilizadas como un modelo para el diseño y la construcción de proteínas con nuevas propiedades que son de interés para la industria (Niehaus *et al.*, 1999) La estabilidad

estructural de las enzimas en los microorganismos termófilos extremos los convierte en candidatos atractivos para la ingeniería de proteínas (Frock & Kelly, 2012). Una ventaja extremadamente valiosa que tienen las enzimas de microorganismos termófilos es que son más estables a temperaturas convencionales que las enzimas de microorganismos mesófilos, esto contribuye evitando la contaminación con otras bacterias durante los procesos. Otra ventaja en los procesos a elevadas temperaturas incluye un alto porcentaje de reacción debido a un descenso de la viscosidad y un aumento en el coeficiente de difusión de los substratos lo cual tiene efectos positivos para las fermentaciones (Kikani, Shukla, & Singh, 2010). En la Tabla 4 se muestran algunas enzimas termoestables con aplicaciones industriales.

Tabla. 4 Aplicación industrial de enzimas termoestables (Demirjian *et al.*, 2001)

Hábitat	Enzimas	Aplicaciones
Altas temperaturas	Amilasas	Glucosa, Fructuosa para los edulcorantes
termófilos moderados (45-65 ° C)	Xilanasas	Blanqueo de papel
Termófilos (65-85 ° C)	Proteasas	Cerveza y detergentes
Hipertermófilos (<85 ° C)	ADN Polimerasa	Ingeniería genética

CAPITULO 2

2.1.-JUSTIFICACIÓN

En el presente proyecto se busca la utilización de un subproducto generado durante la producción del biodiesel obtenido a través de fuentes naturales, el residuo es denominado glicerol, en la actualidad se estima que para este 2016 se lograra una producción de 37 mil millones de galones de biodiesel lo que generaría aproximadamente 4 mil millones de galones de glicerol como residuo de la producción de este biocombustible.(Garlapati, Shankar, & Budhiraja, 2016) El gran interés es la contribución que existe en producir productos de alto valor derivados del glicerol, ya que de no poner atención en este subproducto se estaría considerando como un contaminante y para reducir esta expectativa lo ideal es seguir en la búsqueda para la obtención de productos químicos con un alto valor agregado, que son de gran interés en la industria química, farmacéutica, cosmética, así como también en la industria de pinturas y alimentos. Basado en esto se busca una reducción de costos en los procesos para la elaboración de estos biocombustibles

El método a utilizar es un proceso biotecnológico descrito como un proceso amigable con el ambiente en donde se tiene como objetivo utilizar microorganismos termotolerantes ya que estos ofrecen cada vez mayores ventajas para los procesos biotecnológicos, debido a que contienen enzimas que actúan como biocatalizadores realizando bioconversiones de sustratos a temperaturas elevadas demostrando gran resistencia y estabilidad a la desnaturalización, llegando a proporcionar resultados eficientes en la obtención de productos, generados con más rapidez y una mayor eficiencia.

Basado en esto, se busca utilizar el glicerol como sustrato durante la fermentación con microorganismos termotolerantes a una temperatura de 50°C, obteniendo una mayor solubilidad del sustrato facilitando con esto su oxidación durante el proceso esperando la obtención de productos químicos con un alto valor agregado.

CAPITULO 3

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1.-Hipótesis.

Los microorganismos termotolerantes aislados del noreste de México pueden llevar a cabo la oxidación del glicerol.

3.2.-Objetivo General.

Realizar la biotransformación del glicerol a elevadas temperaturas mediante bioconversión microbiana utilizando microorganismos termotolerantes.

3.3.-Objetivos Específicos.

- 1.- Seleccionar el microorganismo de interés.
- 2.- Realizar la oxidación microbiana del glicerol
- 3.- Purificar el producto de la bioconversión
- 4.- Identificar el producto de la bioconversión
- 5.- Identificar la cepa de utilidad.

CAPITULO 4

MATERIALES Y METODOS

4.1.-Material Biológico

Se utilizaron microorganismos termotolerantes que pertenecen al cepario del laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se utilizaron bacterias termotolerantes aisladas de aguas termales del municipio de Mina, Nuevo León, así como bacterias del género acetobacterias aisladas de manzana.

4.2.-Material Químico

- Cloruro de calcio (Productos Químicos monterrey S.A)
- Sulfato de magnesio
- Glucosa (BD Bioxon)
- Glicerol (Biobasic Canada INC)
- Agar bacteriológico (BD Bioxon)
- Fosfato dibásico de Sodio (Productos Químicos monterrey S.A)
- Extracto de levadura (EM Science)
- Carbonato de Calcio (J.T. Baker)
- Sulfato de amonio (Productos Químicos monterrey S.A)
- Sulfato de magnesio heptahidratado (Desarrollo de especialidades Químicas S.A. de C.V.)
- Fosfato dipotásico (Chemika)
- Sulfato de hierro
- 2-4 Dinitrofenilhidrazina
- Difenilamina
- Ácido clorhídrico (J.T. Baker)
- Ácido acético (J.T. Baker)
- Ácido sulfúrico (J.T. Baker)
- Alcohol etílico (Desarrollo de Especialidades Químicas S.A. de C.V.)
- Kit biología molecular (Bio Basic INC)
- Silica gel 60 (EMD Chemicals Inc)

4.3.-Equipo de laboratorio

- Campana de flujo laminar 36204-04W (Labconco)
- Espectrofotómetro UV-Vis Cary 50 (Varian)
- Incubadora 1525 (SHEL-LAB)
- Incubadora S 16 (SHEL-LAB)
- Incubadora con agitación SHKA4000 (Barnstead International)
- Medidor de pH Orion* 3-Star Plus (Thermo Fischer Scientific)
- Congelador vertical CVPS 15 (TOR-REY)
- Microscopio binocular KF2 (Carl-zeiss)
- Medidor de pH PC 18 (CONDUCTRONIC)
- Centrífuga Centra CL3R (Thermoelectron)
- Centrífuga 5415D (eppendorf)
- Centrífuga Sorvall legend XFR (Thermo Scientific)
- Autoclave 2540M (Tuttnauer)
- Plancha con agitación 984TH7CHSUSA (Thomas Scientific)
- Balanza analítica PA214(Ohaus)
- Pipeta automática
- Pipeta automática
- Pipeta automática
- Termociclador ³Prime (Techne)
- Termomixer C (eppendorf)

.4.4.- Muestreo microbiológico de bacterias termotolerantes

Se hizo una recolección de muestras microbiológicas en aguas termales ubicadas en la comunidad de Espinazo, perteneciente al municipio de Mina N.L. dentro de las siguientes coordenadas, Latitud: 26.2667 Longitud: -101.117 (Figura 6). Se tomaron un total de 14 muestras en diferentes campos de la zona, con el objetivo de tener mayor posibilidad de encontrar microorganismos presentes en este ambiente hidrotermal capaces de crecer a altas temperaturas, las muestras se recolectaron en tubo de 50 ml estéril que se empacaron dentro de una hielera desechable para su traslado de las cuales 7 muestras solo contenían agua termal y las otras 7 muestras se recolectaron con agua termal y restos de sedimentación del fondo del cauce, las muestras se clasificaron de la siguiente manera ilustradas en la tabla 5.

Tabla 5. Identificación en muestras de aguas termales.

# Muestra	Nombre	Asignatura	# Muestra	Nombre	Asignatura
1	ESP 01	A	8	ESP 01	H
2	ESP 01	B	9	ESP 01	I
3	ESP 01	C	10	ESP 01	J
4	ESP 01	D	11	ESP 01	K
5	ESP 01	E	12	ESP 01	L
6	ESP 01	F	13	ESP 01	M
7	ESP 01	G	14	ESP 01	N



Figura 6. Ubicación de la zona de muestreo Estado: Nuevo León Municipio: Mina

Latitud: 26.2667 Longitud: -101.117

4.5.-Muestreo de bacterias Acéticas

Se realizó la búsqueda de cepas acéticas en base a un muestreo que se llevó a cabo en las instalaciones del mercado Mesón Estrella localizado en la colonia centro de Monterrey en la calle Ruperto Martínez entre Colegio Civil y Juan Méndez), Monterrey, Nuevo León, México las coordenadas están indicadas en la figura 7. Para obtener este tipo de bacterias se enfatizó en la búsqueda específica de fruta en estado de descomposición, descrito anteriormente por Y. P. Liu *et al.*, 2013 que lograron aislar bacterias del género *Acetobacter*.

De las muestras obtenidas a partir de las frutas. Se logró el crecimiento de microorganismos en cuatro de las muestras recolectadas. El análisis microscópico de estas, mostro la presencia de bacilos cortos Gram negativos,

característica de las bacterias acéticas. La presencia de las bacterias se confirmó por su crecimiento en medio selectivo.



Figura 7 Coordenadas del mercado mesón estrella en monterrey N.L. México

4.6.-Aislamiento de microorganismos

Para el aislamiento de los microorganismos termotolerantes se utilizó la técnica por estría cruzada en tres campos, utilizando medio Poliextremotolerante (PET) descrito en la tabla 6 y agar bacteriológico con una concentración de 20 g/l para su preparación, para las cepas acéticas se utilizó la misma técnica, pero con el medio selectivo GYC.

Tabla. 6 Composición del medio (PET)

Ingredientes	g/l
CaCl₂	0.2
MgSO₄	0.2
Na₂HPO₄	50 mM
Glucosa	20
Extracto de levadura	1

Las sales de fosfatos se **esterilizan** por separado con un pH de (6.8 – 7).

Nota: para comprobar que la esterilización se realizó correctamente se introduce el material etiquetado con cinta testigo.

4.7.-Crecimiento de las muestras termotolerantes recolectadas

El aislamiento de los microorganismos termotolerantes contenidos en las muestras de aguas termales se hizo en la campana de flujo laminar, se tomaron 50 µl de la muestra y se inocularon sobre 5ml de medio PET en tubos de 10ml, que posteriormente se incubaron a una temperatura de 37°C con una agitación de 100 rpm durante un periodo overnight.

4.8.- Crecimiento de cepas termotolerantes en medio mínimo

Se requirió de inocular en medios mínimos las cepas de aguas termales utilizando en cada medio, diferente fuente de carbono como glucosa y glicerol para observar su comportamiento, ambas fuentes se evaluaron por separado, para observar el crecimiento de los microorganismos. El contenido del medio mínimo se describe en las tablas 7 y 8, mientras que la preparación del medio se describe de la siguiente manera (Angeles & Ramos, 2004).

Método de preparación

- a) Disolver cuidadosamente en el orden indicado excepto la fuente de carbono (glucosa o glicerol)
- b) La fuente de carbono deberá de disolverse en un recipiente separado de las sales
- c) Ajustar el pH del medio de sales (6.5-7)
- d) Agregar el agar (15 g/l) y calentar a ebullición x 1 min
- e) Esterilizar en autoclave mediante las siguientes condiciones 121° C x 15 min a 15 psi
- f) Dejar enfriar aprox. 40° C y mezclar
- g) Distribuir el medio aprox. 25 ml en caja Petri

Medio mínimo.

Tabla 7. Medio mínimo c/glucosa

Ingredientes	g/l
C₆H₁₂O₆ (Glucosa)	10
(NH₄)₂ SO₄	5
Mg SO₄ 7H₂O	2
K₂ HPO₄	2
Fe SO₄	0.1

Tabla 8. Medio mínimo c/glicerol

Ingredientes	g/l
C₃H₈O₃ (Glicerol)	10
(NH₄)₂ SO₄	5
Mg SO₄ 7H₂O	2
K₂ HPO₄	2
Fe SO₄	0.1

4.9.-Crecimiento de bacterias acéticas

Para realizar el crecimiento de las bacterias contenidas en las muestras de frutas recolectadas se dispuso de un medio específico descrito en la (tabla 9) denominado GYC reportado anteriormente por (Casner, 2005) . El aislamiento de las bacterias nativas del género acético se realizó mediante la técnica por estría cruzada.

Tabla 9. Medio selectivo para el crecimiento de bacterias acéticas

Ingredientes	g/l
Glucosa	100
Carbonato de calcio	20
Agar bacteriológico	15
Extracto de levadura	10

4.10.-Crecimiento de bacterias acéticas sobre etanol

Se efectuó el crecimiento de las bacterias acéticas sobre un medio con etanol para comprobar la oxidación del mismo en ácido acético utilizando el medio Frateur descrito en la tabla 10, reportado anteriormente por (Casner, 2005)

Tabla 10. Composición del medio Frateur

Ingredientes	g/l
Etanol	20
Carbonato de calcio	20
Agar bacteriológico	20
Extracto de levadura	10

4.11.-Prueba de crecimiento a diferentes temperaturas en cepas recolectadas

Se determinó la temperatura máxima de crecimiento en los microorganismos aislados de aguas termales, los cuales se sometieron a un proceso de incubación a diferentes temperaturas. Para llevar a cabo este proceso las bacterias son sembradas con 50 µl de inóculo, dentro de la campana de flujo laminar en tubos con 5 ml de medio PET, en seguida se trasladaron a una incubadora con agitación programada con una temperatura de 35°C y una agitación de 100 rpm por un periodo de 12 horas. A partir de este cultivo

bacteriano se realizaron resiembras cada 24 horas tomando 50 μ l de inóculo para 5 ml de medio PET, elevando en cada siembra la temperatura en un rango de 5°C. Hasta llegar a obtener una temperatura máxima de crecimiento de 60°C, las condiciones de agitación se mantuvieron a 100 rpm en cada una de las etapas de crecimiento.

4.12.-Conservación de cepas recolectadas.

Para la conservación de las cepas recolectadas se implementó un método de congelación con una temperatura de -20°C en un congelador vertical. Con el objetivo de mantener puras las bacterias por un largo periodo de tiempo, evitando de esta manera que se puedan llegar a contaminar con otros microorganismos asegurando un buen inóculo en cada una de las siembras posteriores.

El método de conservación se desarrolló de la siguiente forma:

- a) Primero se inoculan 5ml de medio PET estéril, que se deja en fermentación overnight.
- b) Después dentro de la campana de flujo laminar se impregna de inóculo una fracción de papel filtro estéril.
- c) Se deposita sobre un vidrio reloj para que se seque de tal modo que no exista ningún residuo de humedad en el papel.

- d) Una vez seco es depositada en tubos eppendorf de 1ml completamente estériles.
- e) Por último, es puesto en conservación a -20° C.

4.13.-Curva de crecimiento en cepas termotolerantes aisladas

Para estandarizar la cantidad de inóculo y determinar el tiempo con el que se alcanza la densidad óptica deseada, se realizó una curva de crecimiento utilizando un matraz de 250ml en el que se añadieron 50 ml de medio PET, con 250µl de inóculo de un cultivo overnight, posterior a la inoculación se toma 1ml de muestra para medir su absorbancia a 600 nm en un Espectrofotómetro UV-Vis Cary 50 (Varian). Siendo la primera lectura en registrarse como el tiempo cero y a partir de ahí se tomó una muestra cada hora por un periodo de 10 horas y se realizó una última lectura a las 24 horas de incubación. La curva se generó con los siguientes parámetros: una temperatura de 30°C con una agitación de 100 rpm por un periodo de 24 horas.

4.14.- Curva de crecimiento a diferentes temperaturas a cepas termotolerantes aisladas

Siendo la temperatura un parámetro determinante para las cepas termotolerantes con respecto a su desarrollo y capacidad metabólica, se realizó una curva de crecimiento a diferentes temperaturas con los microorganismos de

aguas termales, utilizando el mismo proceso que se empleó para determinar la densidad óptica.

Este proceso se realizó en un rango de temperatura desde 20° C hasta llegar a los 60° C en intervalos de 10°C en cada una de las determinaciones. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

4.15.-Proceso de Oxidación

La oxidación del glicerol se efectuó con las cepas termotolerantes aisladas de aguas termales, a través del proceso en el que se utilizó un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio PET suplementado con el 10 % v/v de glicerol estéril, posteriormente se agregaron 500 µl de inóculo de un cultivo overnight con 0.6 de D.O. Los parámetros de incubación que se utilizan durante el proceso de oxidación son: una temperatura de 50° C con una agitación de 100 rpm. Durante un periodo de 72 horas con un pH inicial de 6.8 – 7.0.

4.16.-Comprobación de la oxidación con cepas ESP 01 A y ESP 01 F

Se llevó a cabo la aplicación del método Brady con el reactivo 2,4 dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH) para determinar la presencia de un producto cetónico derivado de la oxidación del glicerol reportado por (Words, 1995). De esta reacción se obtiene un derivatizado denominado piruvaldehído-bis-2,4-dinitrofenilhidrazona al reaccionar con las cetonas presentes en el sobrenadante que es obtenido a través de la centrifugación de los medios de

fermentación que se realiza mediante las siguientes condiciones a: una velocidad de 4300 rpm por un tiempo de 10 min y 10°C para separar la biomasa del medio.

La preparación del reactivo Brady se realizó mediante el procedimiento reportado por (Rodríguez, Couto, & Szjanman, 2011) la cual se describe a continuación

Se añade 1gr de 2,4-DNFH en 5ml de ácido sulfúrico concentrado, posteriormente esta mezcla es añadida lentamente a una emulsión previamente preparada con 7ml de agua y 25ml de etanol al 96%.

4.17.-Oxidación del glicerol con bacterias acéticas

La fermentación con bacterias acéticas se llevó a cabo mediante la aplicación de una cantidad de inóculo de 100 µl de células en 50 ml de medio PET con la adición de glicerol al 10 % v/v, en condiciones de temperaturas reportadas para bacterias del género acético a 28°C (Paper, 2012), manteniendo la agitación de 100 rpm utilizada en la fermentación con los microorganismos termotolerantes así como el mismo periodo de fermentación por un tiempo de 72 horas.

4.18.-Comprobación de la oxidación con bacterias acéticas

Para realizar la comprobación de la oxidación realizada por las bacterias del género acético se utilizó el mismo método de Brady descrito anteriormente aplicado a la oxidación de las cepas termotolerantes aisladas de aguas termales.

4.19.-Método de purificación.

Para la separación del compuesto que se obtuvo mediante la precipitación con el reactivo Brady, se procedió con la utilización del método cromatografía en capa fina para observar el desplazamiento mediante una fase móvil de metanol/agua y posteriormente realizar una purificación por cromatografía por columna con sílica gel como fase estacionaria y metanol/agua como fase móvil.

4.20.-Curva de calibración patrón DHA

Se elaboró una curva de calibración patrón con un estándar de 1,3-Dihidroxiacetona dímero (DHA), en la que se realizaron 7 lecturas tomadas en un Espectrofotómetro UV-vis Varian Cary 50 de 0 a 120 mg/ml, con variación de 20 mg/ml entre cada estándar, para cuantificar la cantidad del metabolito cetónico presente en el medio por la oxidación del glicerol.

4.21.-Cuantificación de la DHA

Para la cuantificación de la cetona, producto de la oxidación del glicerol contenida en el sobrenadante después de 72 horas de fermentación. Se utiliza el método modificado de cuantificación por espectrofotometría UVvis con un reactivo cromogénico (RCG) reportado por (J. Chen, Chen, & Zhou, 2008) que determina la presencia de la DHA. El reactivo está integrado mediante la siguiente composición; 0.6g de difenilamina en 54ml de ácido acético con 0.6 ml de ácido sulfúrico.

Para realizar la prueba es necesario utilizar 4.5ml de agente cromogénico con 0.5 ml de muestra que se coloca en agua hirviendo por un tiempo modificado de 15 min. La reacción del análisis presenta una coloración azul que se lee en el espectro a una longitud de onda de 615 nm.

4.22.-Pruebas bioquímicas

Con la aplicación de las pruebas bioquímicas se busca de manera preliminar el género al que estas cepas termotolerantes pertenecen, utilizando la aplicación de pruebas para bacterias bacilos Gram positivos como: producción de CATALASA, medio SIM que determina la motilidad de las bacterias así como capacidad de producir indol al combinarse con aldehídos y formar un compuesto rosado y la formación de ácido sulfhídrico y medio TSI (Procedimientos, 2007) con el que se puede determinar la capacidad de fermentar hidratos de carbono y producir sulfuro de hidrógeno denominado

ácido sulfhídrico en solución acuosa. El resultado que estas pruebas determinen en cuanto su género serán confirmados mediante la utilización de técnicas de identificación molecular con el 16s rRNA.

4.23.-Identificación molecular

Para la identificación, molecular se partió de la toma de muestras de un cultivo puro overnight con una D.O. de 0.600 para la cepa ESP 01 A y 0.520 para la cepa ESP 01 F. La extracción del DNA genómico se hizo con el kit de biología molecular (Bio basic INC). Se efectuó la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del gen 16s rARN usando los oligos 27F 5´AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3´ y 1392R 5´GGTTACCTTGTTACGACTT3´ utilizando las siguientes condiciones (Marchesi et al., 1998)

Reacción 1x (50µl concentración final)

- Buffer 10x: 5µl
- dNTP´s 10mM: 1µl
- Cebador 27 F 10 mM: 1µl
- Cebador 1392R 10mM: 1µl
- Taq polimerasa (GenScript): .25µl
- DNA: 10 ng
- H₂O miliQ: Completar a 50µl

Parámetros de amplificación:

- Desnaturalización inicial: 5 min a 95°C
- Desnaturalización 1 min a 95°C (30 ciclos)
- Alineamiento: 1 min a 55°C (30 ciclos)
- Polimerización: 1.5 min a 72°C (30 ciclos)
- Extensión final 5min a 72°C

Las muestras se enviaron a MACROGEN USA para su secuenciación.

DISPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS

La disposición de residuos se realiza de acuerdo a lo establecido por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Capítulo 5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.-Aislamiento de cepas termotolerantes recolectadas

Mediante la aplicación de la técnica de aislamiento por siembra cruzada se logró la purificación de las cepas recolectadas de aguas termales de Espinazo N.L. obteniendo una gran variedad de bacilos cortos Gram positivos mostrados en las figuras 8 y 9.

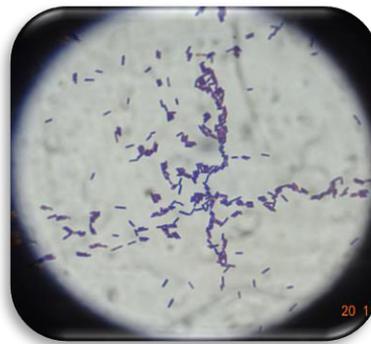


Figura 8 Morfología microscópica de la bacteria clasificada como ESP01 A donde se observan bacilos cortos Gram positivo.



Figura 9 Morfología microscópica de la bacteria clasificada como ESP01 F donde se observan bacilos cortos Gram positivo.

5.2.-Aislamiento de bacterias acéticas

En el medio selectivo para bacterias acéticas, se observó crecimiento de levaduras por lo que se realizó la purificación por la técnica antes mencionada y las observaciones macro y microscópicas se muestran en las figuras 10, 11 y 12 respectivamente.



Figura 10. Crecimiento de bacterias acéticas en medio selectivo GYC.

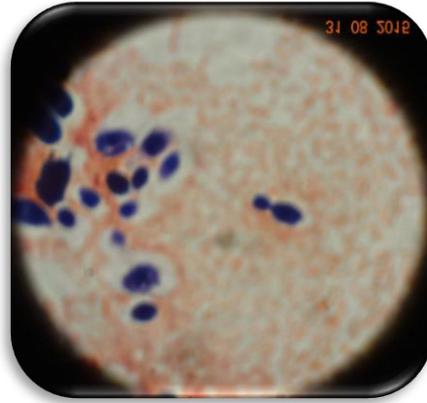


Figura 11. Imagen que representa el crecimiento de bacterias acéticas contaminadas con levaduras.

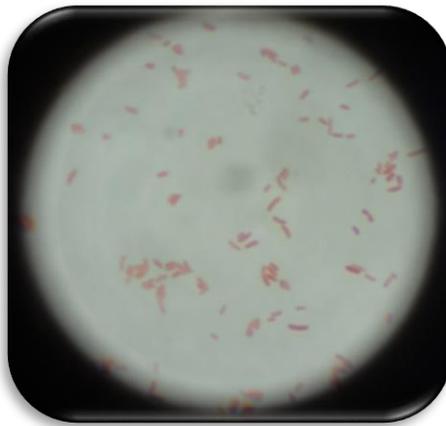


Figura 12. Bacterias acéticas después de la purificación donde se observan bacilos cortos Gram negativos.

5.3.-Crecimiento de las bacterias presentes en las muestras de aguas termales

Las bacterias presentes en las muestras recolectadas de aguas termales en Espinazo N.L. presentaron a partir de las 24 horas una turbidez característica que refleja el crecimiento de la biomasa presente en el caldo de cultivo durante el periodo de la incubación.

5.4.-Crecimiento en medio mínimo

Durante la aplicación de este proceso se observó de manera muy cualitativa que las bacterias crecieron de una forma más rápida y abundante en el medio que contenía glucosa como única fuente de carbono a diferencia del medio que contenía solo glicerol como fuente de carbono ya que se apreciaba un crecimiento más lento de microorganismos. Se ha reportado que al utilizar una fuente de carbono más simple puede inducir el crecimiento de las bacterias así como el de las enzimas, con esto promover que lleven a cabo una oxidación del glicerol más eficiente para la producción del metabolito de interés y no a usarlo para su desarrollo como lo reportan Z. Hu *et al.* (2010), ya que anteriormente esta reportado por Lili, Jie, Zhongce, Yuguo, & Wei(2006) que los microorganismos *Acetobacter sp* utilizados durante la aplicación del proyecto llegaron a consumir hasta un 29% del glicerol como fuente de carbono durante la fermentación.

5.5.-Crecimiento de bacterias acéticas

Con el medio GYC se logró un crecimiento abundante de bacterias, a partir de muestras recolectadas en manzanas en estado de descomposición. Se purificaron con la aplicación de la técnica siembra en placa por estría cruzada, se obtuvieron de manera aislada cuatro cepas que se etiquetaron como: Bacteria Acet. 1, Acet. 2, Acet. 3 y Acet. 4, todas ellas correspondieron a bacilos Gram negativos.

5.6.-Crecimiento de bacterias acéticas sobre etanol

Con la aplicación del medio Frateur, se comprobó que las bacterias pueden oxidar el etanol y convertirlo en ácido acético que se encarga de reducir la concentración del carbonato de calcio y formar un halo claro alrededor de las colonias bacterianas mostradas en las figura 13 y 14.

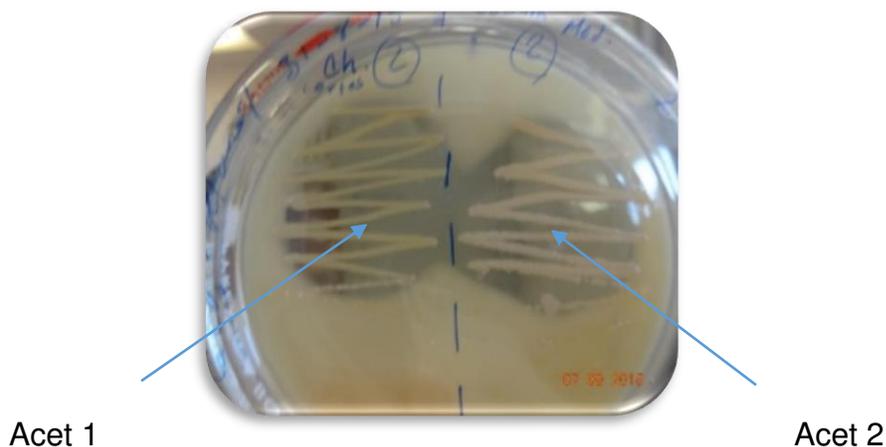


Figura 13. Imagen representando el halo claro formado por las bacterias acéticas Acet 1 halo izquierdo y Acet 2 halo derecho.



Figura 14. Imagen representando el halo claro formado por las bacterias acéticas Acet 3 halo izquierdo y Acet 4 halo derecho.

5.7.-Proceso de crecimiento a diferentes temperaturas en cepas recolectadas

Después del aislamiento y la purificación se logró el crecimiento de microorganismos hasta llegar a una temperatura de 60°C en dos de las muestras identificadas como: ESP 01 A y ESP 01 F. Específicamente el crecimiento se dio en muestras recolectadas de aguas termales de espinazo N.L. que contenían sedimentación del suelo por donde lleva su cauce el agua termal. Por lo anterior las muestras que no mostraron crecimiento a temperaturas de 60°C se descartaron para este proyecto, que se tiene como objetivo la oxidación del glicerol a temperaturas elevadas de 50°C. Como se mencionó anteriormente en la etapa de aislamiento y purificación, las cepas aisladas pertenecen a bacilos cortos Gram positivos los cuales se pudieron

observar mediante la aplicación de una tinción Gram. Las imágenes 8 y 9 se muestran en la página 35 y 36.

5.8.-Conservación de cepas aisladas

El método de conservación implementado en este proyecto mediante la aplicación de temperaturas de congelación a -20°C demostró que es un método de conservación seguro para la conservación en particular de estos microorganismos que evita el trabajo de aislamiento de las cepas en caso de una contaminación con otro microorganismo.

5.9.-Curva de crecimiento en cepas aisladas

Con la realización de la curva de crecimiento fue posible determinar el tiempo que les lleva a los microorganismos termotolerantes ESP 01 A y 01 F, llegar a una concentración de biomasa con un valor 0.6 de densidad óptica (D.O.). Este valor se alcanza aproximadamente a las 9 horas de fermentación como se observa en la figura 15.

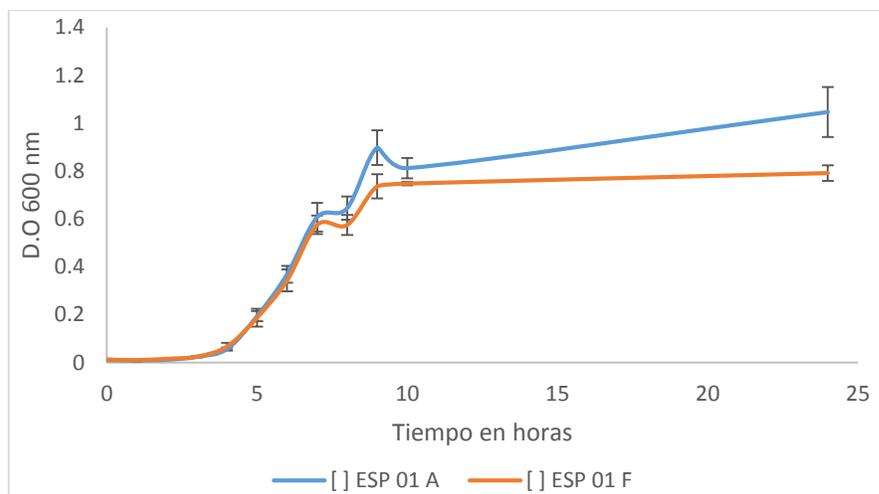


Fig. 15 Curva de crecimiento a 30°C de las cepas ESP 01 A y F.

En la cinética de crecimiento realizada a los microorganismos ESP01 A y 01 F a 30°C se observa que ambas cepas presentan gran similitud con respecto a su comportamiento en cada una de las etapas de adaptación y fase exponencial, mientras que en la fase estacionaria existe una ligera diferencia ya que en la cepa ESP 01 A presenta un crecimiento más pronunciado que la cepa ESP 01 F. Al presentarse esta diferencia y en comparación con las características de las colonias en medio sólido, se puede mencionar que corresponde a dos cepas de la misma especie lo cual se estará confirmando mediante las pruebas moleculares a través de la secuenciación del 16s rRNA.

5.10.-Curva de crecimiento a diferentes temperaturas

Mediante la aplicación de las diferentes temperaturas de incubación se puede observar diferencia en cada una de las etapas de crecimiento. Con la

aplicación de 20°C se puede observar que las cepas tiene una fase de adaptación muy larga con respecto a las demás temperaturas mostrando un ligero crecimiento que se refleja en un largo periodo de tiempo para llegar a su fase estacionaria, por otro lado con la aplicación de la temperatura a 50° se observa un periodo de adaptación más corto para llegar a la fase estacionaria, este resultado puede favorecer el proceso de fermentación en las cepas ESP 01 A y ESP 01 F, como se muestra en las figuras 16 y 17.

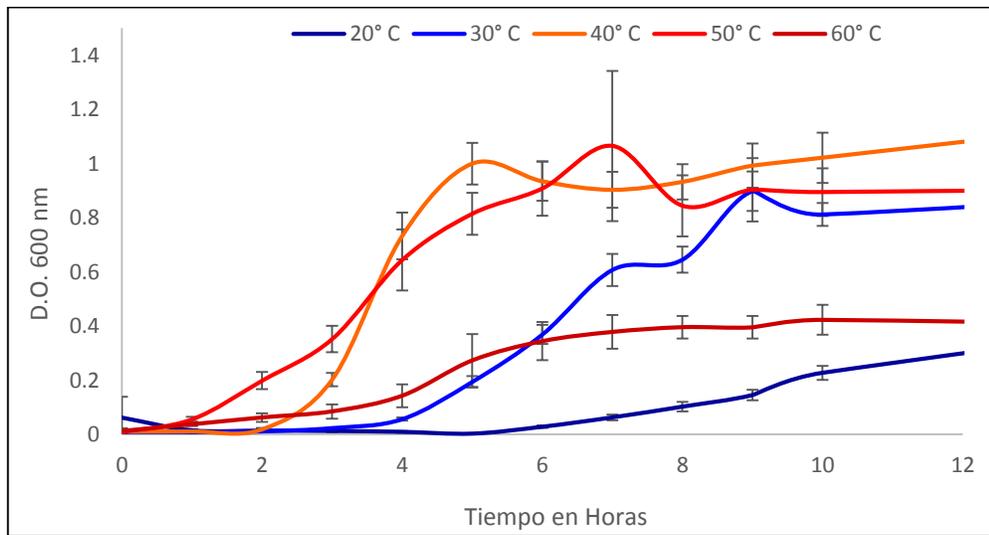


Fig. 16 Curva de crecimiento de la cepa ESP 01 A a diferentes temperaturas.

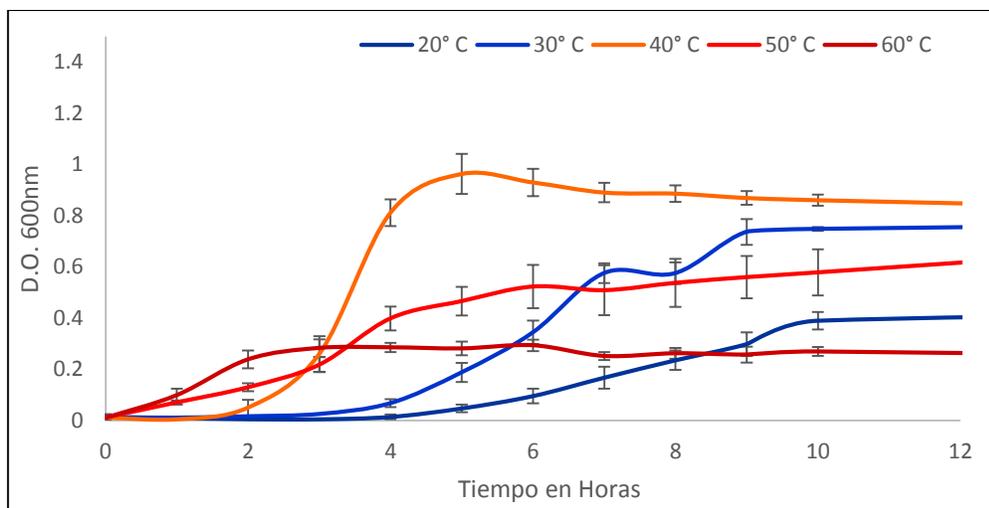


Fig. 17 Curva de crecimiento de la cepa ESP 01 F a diferentes temperaturas.

5.11.-Proceso de Oxidación con cepas termotolerantes aisladas

Durante el proceso de fermentación para llevar a cabo la oxidación del glicerol se realizó el monitoreo del pH tomando lecturas cada 12 horas, que mostraron un descenso del pH después de las 24 horas, el pH de inicio se registró en 6.7 para los medios de cultivo adicionados con el 10% de glicerol, por otro lado los parámetros como temperatura y agitación se mantuvieron de forma constante durante todo el periodo de fermentación.

La disminución del pH para la cepa ESP 01 A fue hasta llegar a 4.97 y para la cepa ESP 01 F registró un pH de 5.62 al término de la fermentación que tuvo un tiempo de 72 horas, este efecto puede ser asociado a la ruta metabólica de las bacterias, posiblemente por la aparición de un metabolito producido por los microorganismos que se liberó al medio de cultivo. Posiblemente esto esté contribuyendo en la producción de la dihidroxiacetona ya que esta reportado por Hoist, Enfors, & Mattiasson, (1982) que un valor de pH 5.0 en el medio es un

valor óptimo para llevar a cabo la producción de la DHA con las bacterias del genero acético como la utilizada por ellos (*Gluconobacter oxydans*). Esto coincide con lo reportado por Z. Hu et al., 2010 que observaron la mayor producción de DHA en una lectura a pH 5.0 con lo que concluyeron que a pH bajos, se podría estar favoreciendo la producción de la DHA, utilizando la bacteria *Gluconobacter oxydans* ZJB09112. Este efecto también fue reportado por Stasiak-Rzaska et al., 2014) donde la producción de la DHA es producida en el espacio periplásmico de la célula a pH 5.0-5.5 por la glicerol deshidrogenasa; principal enzima en realizar la oxidación del glicerol en DHA. Por lo anterior, se considera que el glicerol está siendo oxidado por las bacterias termotolerantes en un pH ácido.

5.12.- Comprobación de la oxidación por bacterias termotolerantes

El método utilizado para determinar la oxidación del glicerol mediante la formación de un derivado mostró resultados positivos a la presencia de un compuesto cetónico contenido en el sobrenadante derivado de la fermentación con los microorganismos termotolerantes de aguas termales clasificadas como ESP 01 A Y ESP 01 F como se observa en la figura 18.

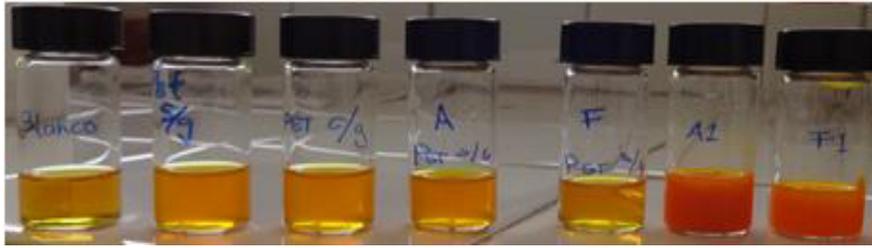


Fig. 18 Determinación de la cetona presente en el medio de fermentación donde se observa un precipitado de color naranja suspendido en el medio.

El resultado de la oxidación se comprobó mediante la aplicación de controles, utilizando agua como blanco en el vial 1, en el vial 2 se dispuso el medio de cultivo PET sin glicerol, el vial 3 contiene medio PET con glicerol pero sin microorganismos respectivamente como controles negativos, para el vial 4 y 5 medio PET ambos viales sin glicerol y con inóculo de cada cepa (A y F) también como controles negativos y por último, en los viales restantes se añadió el medio de fermentación con glicerol inoculados con las cepas ESP01 a y ESP 01 f. Dando los resultados esperados de la prueba con el reactivo de Brady, donde los viales 6 y 7 muestran la oxidación del glicerol a un compuesto cetónico

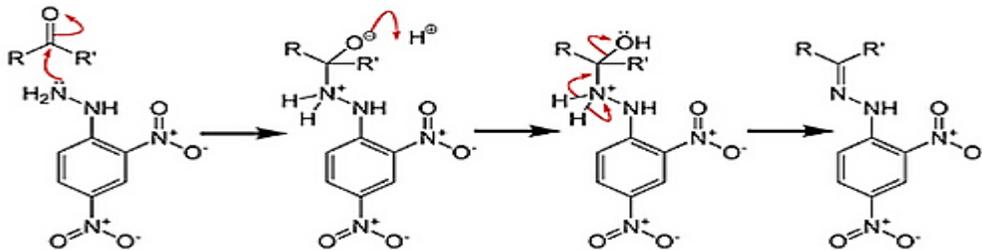


Fig.19 Representación de la reacción de la 2,4-DNFH y la cetona. Adaptado de Chemistry in Context, 4ª edición.

que se presenta como un precipitado rojo en suspensión, mientras que en los demás viales no se observa la presencia del precipitado ni del color naranja del derivado.

Mediante el método Brady se demostró la presencia de la DHA en las muestras proveniente por la interacción del glicerol con el cultivo bacteriano, mientras que los viales que no muestran algunos de estos factores se consideraron como resultados negativos.

5.13.- Comprobación de la oxidación con bacterias acéticas

Los resultados de la oxidación del glicerol obtenidos después de la fermentación con bacterias acéticas mediante la aplicación del reactivo Brady, fue negativo al no presentar el precipitado característico en ninguna de las muestras después de las 72 horas de fermentación como se muestra en la figura 20.



Fig. 20 Representación de la oxidación del glicerol con bacterias acéticas.

La descripción de los viales de izquierda a derecha utilizados; el primer vial se encuentra el blanco (agua), en el segundo vial el control medio (PET) y en los viales 3, 4, 5 y 6 muestras del sobrenadante producto de la fermentación

realizada por las bacterias acéticas identificadas como Acet. 1, 2, 3 y 4. Con la obtención de este resultado negativo se descartó seguir utilizando estas bacterias para realizar la oxidación del glicerol.

5.14.-Comprobación de la presencia de la DHA por Cromatografía en Capa

Fina.

Para la separación del compuesto cetónico presente en la muestra se efectuaron diferentes concentraciones de metanol/agua que van de 90/10, 80/20 y 75/25 en el que se comprobó el desplazamiento de la muestra presente en el medio durante la cromatografía en capa fina como se observa en la figura 21. Los resultados mostraron un mejor desplazamiento con la concentración de 75/25 misma que se utilizó en la cromatografía por columna para la separación y obtención del compuesto de interés.



Fig. 21 Cromatografía en Placa Fina del producto de fermentación de las cepas A (carril 1) y F (carril 2). Fase móvil metanol/agua 75/25, revelado con 2,4 DNPH. Representación de la comprobación del desplazamiento de la DHA presente en el medio de fermentación.

La muestra después de ser obtenidas mediante la purificación por la columna se analizó con el reactivo 2,4-DNFH para identificar y confirmar la presencia de la DHA contenidas en los viales. Las fracciones recolectadas se pueden observar en los viales 6 y 7 de izquierda a derecha como se observa en la figura 22. Las cuales se enviaron para ser analizadas por espectrofotometría infrarroja.



Fig. 22 Imagen en la que se observa las fracciones obtenidas con resultado positivo a la presencia del derivado cetónico con el reactivo de Brady durante la purificación de la DHA (viales 6 y 7).

Con los resultados obtenidos mediante el análisis espectrofotométrico de infrarrojo se puede observar la aparición de un pico localizado en el rango entre 1600 y 1720 representando el grupo $C=O$, que hace referencia a la presencia un compuesto cetónico. (A.Yaylayan, Harty-Majors, & A. Ismail, 1999). Esto se comparó con el espectro obtenido de una muestra estándar donde presentó intensidades relativas de bandas que determinan la presencia de un carbonilo

en el rango de (1710-1760 cm^{-1}) de una solución al 2% de dímero de dihidroxiacetona en la figura 26.

En las figuras 23 y 24 se puede observar la presencia de un pico entre los valores antes reportados los cuales se encuentran localizados a 1720 cm^{-1} en los espectros tomados a cada una de las cepas ESP 01 A y 01 F, mientras que el espectro realizado al glicerol como control (figura 25), no se observa la banda en el mismo rango de valores reportado.

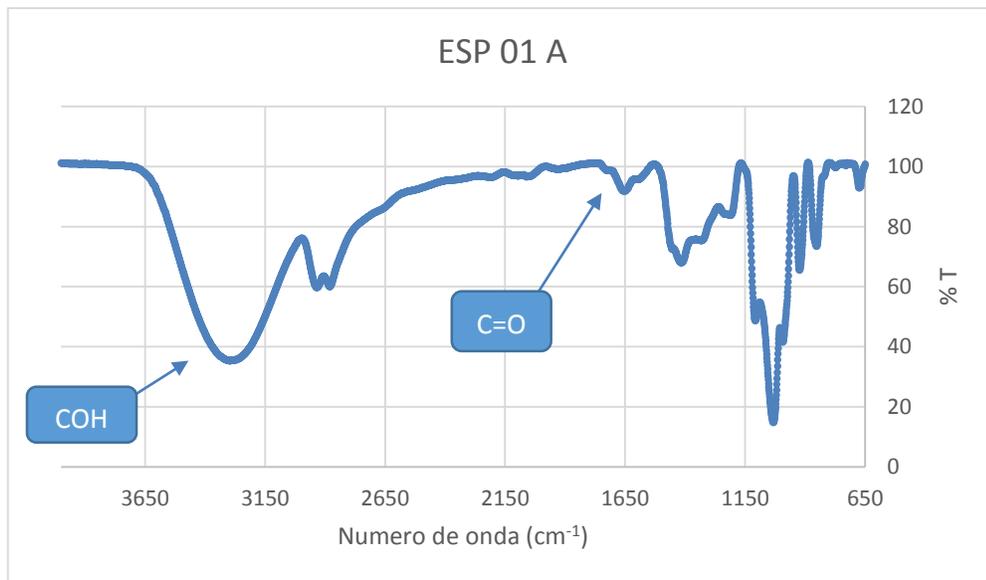


Fig. 23 FTIR de la oxidación con la cepa ESP 01 A. Intensidad de una banda presente entre el rango 1720 cm^{-1} que hace referencia de la DHA presente por la oxidación del glicerol.

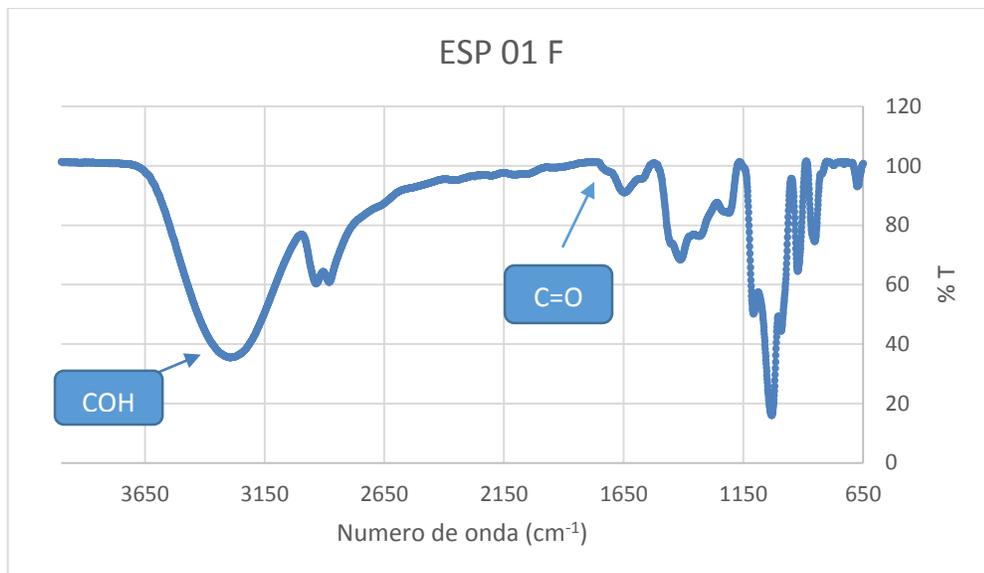


Fig. 24 FTIR de la oxidación con la cepa ESP 01 F. Intensidad de una banda presente entre el rango 1720 que hace referencia de la DHA presente por la oxidación del glicerol.



Fig.25 FTIR del glicerol utilizado como control.

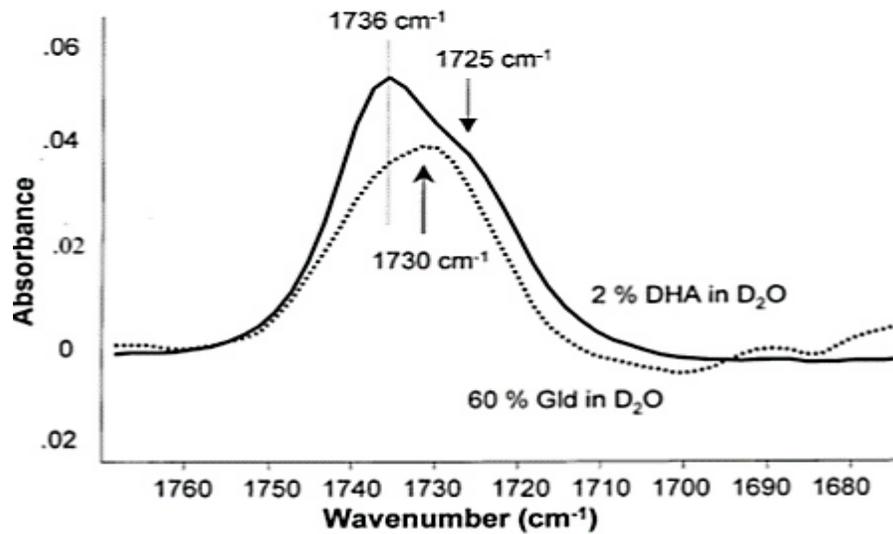


Fig. 26 Espectro FT-IR representativo de un carbonilo localizado con una intensidad de banda en el rango de 1710-1760 cm⁻¹.

5.15.-Curva de calibración para cuantificación de DHA

Mediante la realización de la curva de calibración se tomó la regresión lineal y la ecuación de la recta resultado de las absorbancias correspondientes de 0 a 120 mg/ml de un estándar de DHA mostrada en la (figura 27). Estos datos se utilizaron para cuantificar la producción generada por la bioconversión del glicerol por los microorganismos durante la fermentación.

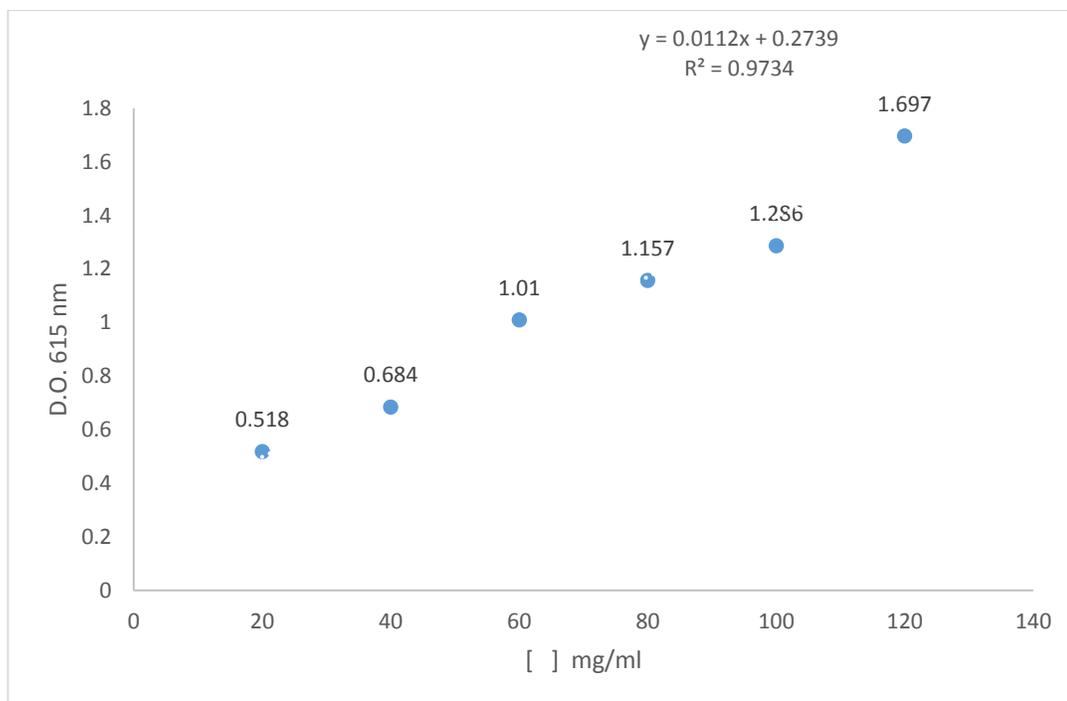


Fig. 27 Curva de calibración DHA y ecuación de la recta.

5.16.-Cuantificación de la DHA

Con la aplicación del RCG fue posible realizar la cuantificación de la DHA presente en el sobrenadante. Esto al mostrar una coloración azul durante el proceso de reacción que es reportado por J. Chen et al., (2008) donde hace referencia al detectarse por el RCG, como un método espectrofotométrico UV vis de rápido análisis y de bajo costo al considerarse un agente específico para la determinación de la DHA.

El resultado de la cuantificación se puede observar en las (figuras 28 y 29) mostrando un periodo de adaptación donde se mantiene la producción constante y a partir de las 36 horas se ve claramente cómo se desencadena la

producción de la DHA. La máxima producción se reflejó en un tiempo de fermentación de 60 horas en ambos procesos con las cepas ESP 01 A y ESP 01 F. En cuanto a la cantidad producida se refleja una ligera diferencia producida por ambas cepas, ya que se observó que con la cepa ESP 01 A se obtuvo una cantidad de 52.45 g/l de DHA mientras que la producción realizada por la cepa ESP 01 F se logró la obtención de 37.27 g/l de DHA.

Con los resultados obtenidos por la cuantificación se determina que se ha logrado la obtención de un 52 % de DHA como el mayor índice de producción por las cepas termotolerantes utilizadas en este proyecto, sin embargo, esta producción se encuentra por debajo de otros reportes de producción de DHA, por ejemplo J. Chen et al., (2008) reportó que al utilizar *Acetobacter suboxydans* ATCC621 donde la DHA fue cuantificada con el agente cromogénico, obtuvo una producción de 72.10 g/l a las 76 horas de fermentación. Comparando con otros resultados obtenidos con la utilización de diferente género y especie (Z. Liu, Hu, Zheng, & Shen, 2008) al utilizar el género *Pichia membranifaciens* reportan una producción con una concentración máxima de DHA de 13.57 g/l con un tiempo de fermentación de 48.8 horas.

Así como también la producción realizada con *Gluconobacter oxydans* ZBJ 09112 en donde es reportada una producción de 161.9 g/l de DHA a las 68 horas de fermentación a través de la utilización de un biorreactor de columna considerando diferentes fuentes de carbono como el manitol reportado por Z. Hu et al., (2010) como una fuente de carbono óptima que induce la formación de la membrana intracitoplasmática dando como resultado un aumento en la

actividad catalítica de la enzima glicerol deshidrogenasa. Se puede mencionar que es posible mejorar la producción generada con las bacterias termotolerantes estudiando diferentes medios de cultivo en donde se prueben diferentes fuentes de carbono en combinación con el glicerol con las que se busque la inducción de las enzimas contenidas en estas bacterias para optimizar los resultados de la producción de DHA. Por otro lado, se pueden utilizar herramientas estadísticas como diseños de experimentos, por ejemplo los utilizados por Y. P. Liu et al., (2013) donde se logró la optimización al utilizar diferentes fuentes de nitrógeno en donde se deduce al extracto de levadura como mejor fuente de nitrógeno en comparación con la peptona. Otro parámetro útil para la optimización es la utilización de diferentes fuentes de nitrógeno con los que se obtuvo una producción de 125.8 g/l en 48 horas de fermentación con bacterias *Gluconobacter frateurii* CGMCC 5397, además de la utilización de este género mencionado anteriormente *Gluconobacter frateurii* CGMCC 5397 en esta ocasión descrito por Zheng, Jin, Zhang, Wang, & Liu, (2015) donde se mostró una mayor producción de DHA en un tiempo de 40 horas de fermentación obteniendo 175 g/l aplicando diferentes concentraciones de oxígeno en un biorreactor por lotes alimentado. Con lo anterior se menciona otro factor a considerar para realizar una mejor producción de DHA que es la fuente de aireación la cual se puede logra por diferentes formas reportadas (Hoist et al., 1982) ya sea con una mayor agitación para proporcionar una mayor oxigenación en el medio o con la adición de peróxido de hidrógeno ya que el género *Gluconobacter* tiene una alta actividad de la enzima catalasa convirtiendo el peróxido en oxígeno y agua.

Cabe mencionar que estas enzimas son parte del contenido enzimático ya que dio un resultado positivo la prueba catalasa encontradas en las bacterias termotolerantes al realizar las pruebas bioquímicas preliminares para la identificación con respecto al género al que pertenecen las cepas ESP 01 A y ESP 01 F información que se muestra en la tabla 13.

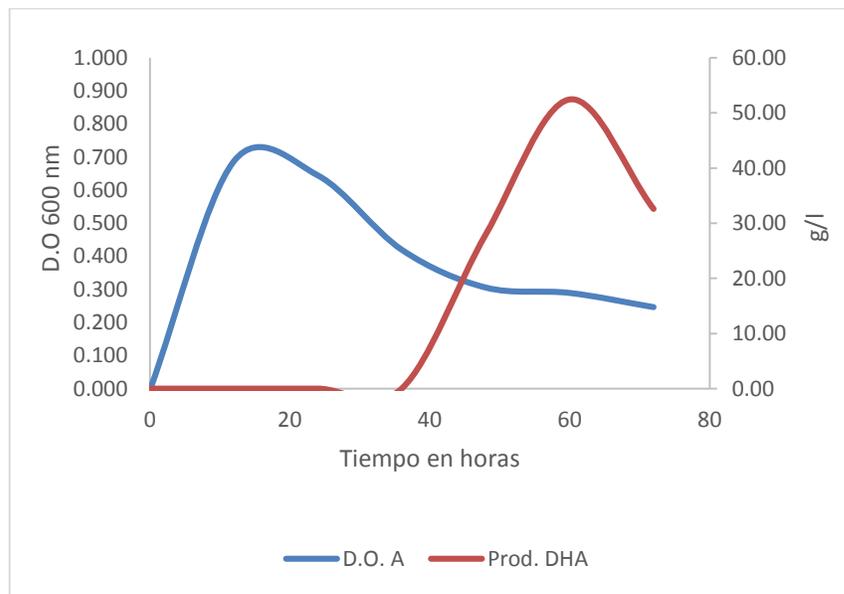


Fig. 28 Crecimiento de la bacteria ESP 01 A expresado mediante la densidad óptica y la producción de DHA con respecto al tiempo.

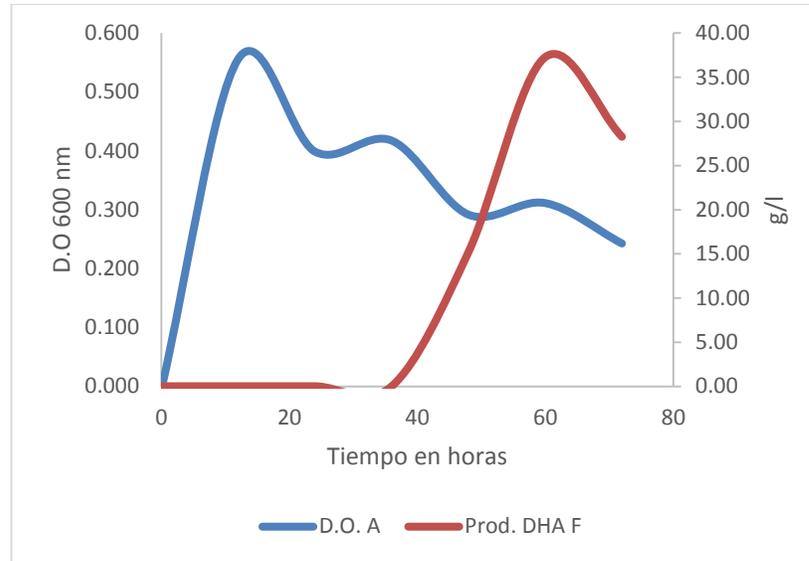


Fig.29 Crecimiento de la bacteria ESP 01 F expresado mediante la densidad óptica y la producción de DHA con respecto al tiempo.

5.17.-Pruebas bioquímicas en cepas ESP 01 A y ESP 01 F

Los resultados de las pruebas bioquímicas establecidas se muestran en la tabla 11. Dando datos preliminares con los que se determinó que los microorganismos Gram positivos pertenecen al género *Bacillus*, resultado que más adelante es confirmada con la aplicación de pruebas moleculares utilizando la amplificación del gen que codifica para la región del 16s rRNA.

Tabla 11 resultado de las pruebas bioquímicas.

Pruebas	ESP01 A	ESP01 F
Crecimiento	Aerobio	Aerobio
Catalasa	+	+
TSI	ESP01 A	ESP01 F
Fermentación Lactosa	+	-
Fermentación Glucosa	+	+
Producción Gas	-	-
Producción SH ₂	-	-
SIM		
Movilidad	-	-
Indol	-	-
Producción de Ac. Sulfhídrico	-	-

5.18.-Identificación molecular

La extracción del DNA de las bacterias ESP 01 A y ESP 01 F se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %, mostrada en la (figura 30). Donde se puede observar en el primer carril el control molecular y el segundo carril corresponde a la bacteria ESP 01 F y el tercer carril es el DNA correspondiente a la bacteria ESP 01 A.

La cantidad de DNA obtenida se analizó mediante nanodrop, la concentración obtenida de 10 ng/μl fue cantidad suficiente para la amplificación del 16s rRNA. Se comprobó presencia del amplicon del 16s rARN, utilizando electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %, mostrada en la (figura 31). Obteniendo una cantidad de DNA genómico amplificado suficiente para realizar la identificación de las

cepas ESP 01 A y ESP 01 F. teniendo en el primer carril el control molecular en el segundo y tercer carril la amplificación de la cepa A y F y el cuarto carril el control negativo.

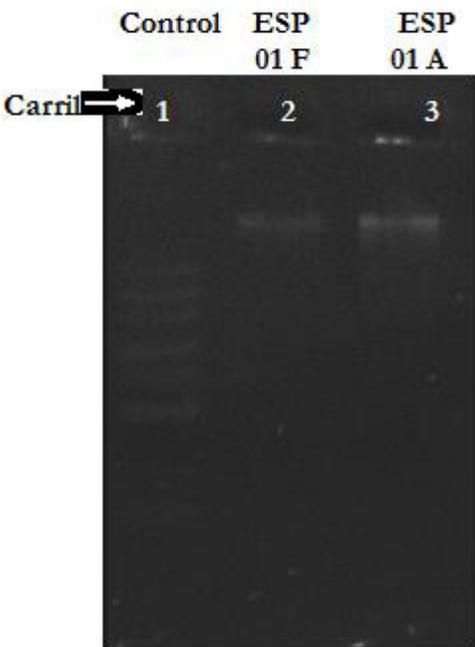


Figura 30. Comprobación del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa carril 1 control molecular, 2 y 3 cepas termotolerantes ESP 01 A y ESP 01 F.

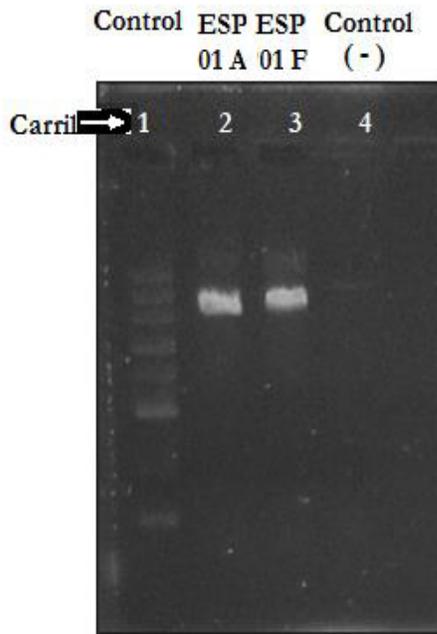


Figura 31. Comprobación de la amplificación 16s rARN mediante electroforesis en gel de agarosa carril 1 control molecular, 2 y 3 cepas A y F y 4 control negativo

5.19.-Identificación a nivel especie

Los resultados obtenidos mediante la identificación molecular realizada a través del BLAST en la base de datos del NCBI arrojó un resultado con un 99% de identidad y un valor de E de 0 donde ambas bacterias son *Bacillus licheniformis*

Secuencia reportada para la identificación de la cepa ESP 01 A 99 % identidad

CTTCGGCGGCTGGCTCCAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGG
TGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAAC
GTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCAC
GCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATT
GGCTTAGCCTCGCGGCTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCACGT
GTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT
CCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGG
CAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCA
CGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAG
GGGAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGT
TCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCC
CCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCAGGCGGA
GTGCTTAATGCGTTTGTGTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACT
TAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCCG
CTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTGCCT
TCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGG
AATCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCT
CCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGC
GCGCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACC
GCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAA
GGTACCGCCCTATTGAAACGGTACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGTTTT
ACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGCGTGTGCTCCGTCAGACTTTC
GTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCC

Secuencia reportada para la identificación de la cepa ESP 01 F 99 % identidad

GGCGGCTGGCTCCAAANGGTTACCTCACCGACTTCG
GGTGTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGA
ACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTC
ACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGA
TTGGCTTAGCCTCGCGGCTTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCAC
GTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACC
TTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCT
GGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT
CACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGA
AGGGGAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAG
GTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG
CCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCG
GAGTGCTTAATGCGTTTGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACA
CTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
CGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGC
CTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGT
GGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACC
CTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGC
GCGCGCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTA
CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTC
AAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTGTTCCTCCCTAACAAACAGAGTT
TTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTT
TCGTCCATTGCGGAAGATTCCNTACTGCTGCCTCCCGTAGGAATCTGGGC
CGTGTCTCAGTCCCAGTGGGNCC

Capítulo 6.

CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento de microorganismo termotolerantes a partir de aguas termales localizadas en el noreste de México en la comunidad de Espinazo Nuevo León a partir de un screening realizado en las muestras, los microorganismos encontrados con las características de crecimiento a altas temperaturas se encontraron en muestras de sedimentación del cauce hidrotermal que crecen a temperaturas de 50-60°C .Los microorganismos aislados de Espinazo Nuevo León, mostraron la capacidad de oxidar el glicerol en DHA a temperaturas elevadas.

El resultado del análisis de la secuenciación obtenido en ambas cepas se cuantificó mediante el programa BLAST, que permitió identificar la secuencia del 16s rARN dando un resultado para ambas cepas las cuales pertenecen al género *Bacillus licheniformes*.

Este es el primer reporte que se tiene de este tipo bacterias Gram positivas utilizadas en procesos para la oxidación del glicerol, ya que dentro de la bibliografía revisada no se encontró tema referente al presente proyecto de investigación.

Capítulo 7.

Perspectivas

La gran cantidad de glicerol que se está generando por la producción del biodiesel está siendo de gran interés para los investigadores ya que se busca la aplicación de métodos de bioconversión que generen producto de gran valor agregado a partir de este subproducto.

En el presente trabajo se pudo comprobar la oxidación del glicerol con la utilización de las cepas *Bacillus licheniformis*. Motivo por el que se propone que se siga con la búsqueda de diferentes condiciones de cultivo para la producción de estos productos mediante la aplicación de un método de optimización mejorando la producción de los derivados de la oxidación del glicerol.

A si como también seguir realizando proyectos con respecto a la búsqueda de su contenido enzimático ya que las aplicaciones en la industria de estas enzimas son muy utilizadas para la elaboración de los detergentes.

8 BIBLIOGRAFIA

- A. Yaylayan, V., Harty-Majors, S., & A. Ismail, A. (1999). Investigation of DL-glyceraldehyde-dihydroxyacetone interconversion by FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 318(1-4), 20–25. [http://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00077-4](http://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00077-4)
- Almeida, J. R. M., Fávaro, L. C. L., & Quirino, B. F. (2012). Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 48. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-5-48>
- Angeles, M. D. L., & Ramos, A. (2004). *Tinción diferencial de Gram y tinciones selectivas. Manual de prácticas laboratorio.*
- Black, C. S., & Nair, G. R. (2013). Bioconversion of Glycerol to Dihydroxyacetone by Immobilized Gluconacetobacter Xylinus Cells, 4(5), 10–14. <http://doi.org/10.7763/IJCEA.2013.V4.316>
- Casner, O. A. P. (2005). Obtención de Condiciones de Elaboración de Vinagre de Arándanos (*Vaccinium corymbosum*) Utilizando Torta de Prensa.
- Chen, J., Chen, J., & Zhou, C. (2008). HPLC methods for determination of dihydroxyacetone and glycerol in fermentation broth and comparison with a visible spectrophotometric method to determine dihydroxyacetone. *Journal of Chromatographic Science*, 46(10), 912–916.
- Chen, T., & Romesberg, F. E. (2014). Directed polymerase evolution. *FEBS Letters*, 588(2), 219–229. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.040>
- Claret, C., Salmon, J. M., Romieu, C., & Bories, A. (1994). Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol, 359–365.
- da Silva, G. P., Mack, M., & Contiero, J. (2009). Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27(1), 30–39. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006>
- Demirjian, D. C., Morís-Varas, F., & Cassidy, C. S. (2001). Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(2), 144–151. [http://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00183-6](http://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00183-6)
- Fallis, A. . (2013). No Title No Title. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ferrero, A. J., Rosa, I. M., & Veneciano, E. (1994). Proceso de purificación de glicerina obtenida del biodiesel a pequeña escala, 7.
- Frock, A. D., & Kelly, R. M. (2012). Extreme thermophiles: Moving beyond

- single-enzyme biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 1(4), 363–372. <http://doi.org/10.1016/j.coche.2012.07.003>
- Garlapati, V. K., Shankar, U., & Budhiraja, A. (2016). Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. *Biotechnology Reports*, 9, 9–14. <http://doi.org/10.1016/j.btre.2015.11.002>
- Habe, H., Fukuoka, T., Kitamoto, D., & Sakaki, K. (2009a). Biotechnological production of d-glyceric acid and its application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(3), 445–452. <http://doi.org/10.1007/s00253-009-2124-3>
- Habe, H., Fukuoka, T., Kitamoto, D., & Sakaki, K. (2009b). Biotransformation of glycerol to D-glyceric acid by *Acetobacter tropicalis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(6), 1033–1039. <http://doi.org/10.1007/s00253-008-1737-2>
- Habe, H., Shimada, Y., Yakushi, T., Hattori, H., Ano, Y., Fukuoka, T., ... Sakaki, K. (2009). Microbial production of glyceric acid, an organic acid that can be mass produced from glycerol. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24), 7760–7766. <http://doi.org/10.1128/AEM.01535-09>
- Hoist, O., Enfors, S., & Mattiasson, B. (1982). *Applied Microbiology and Biotechnology* Oxygenation of Immobilized Cells Using Hydrogen-Peroxide ; A Model Study of *Gluconobacter oxydans* Converting Glycerol to Dihydroxyacetone H₂COH, 64–68.
- Hu, Z. C., Zheng, Y. G., & Shen, Y. C. (2011). Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, 102(14), 7177–7182. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.078>
- Hu, Z., Liu, Z., & Zheng, Y. (2010). Production of 1, 3-dihydroxyacetone from glycerol by *Gluconobacter oxydans* ZJB09112. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(December 2009), 340–345. <http://doi.org/10.4014/jmb.0907.07011>
- Ibrahim, D., Zhu, H. L., Yusef, N., Isnaeni, & Limdheh Hong. (2013). *Bacillus licheniformis* BT5.9 isolated from changar hop spring, malang, indonesia as a producer of Thermostable α -amylase. *Tropical Life Sciences*, 24(1), 72–84.
- Katryniok, B., Kimura, H., Skrzyńska, E., Girardon, J.-S., Fongarland, P., Capron, M., ... Dumeignil, F. (2011). Selective catalytic oxidation of glycerol: perspectives for high value chemicals. *Green Chemistry*, 13(8), 1960. <http://doi.org/10.1039/c1gc15320j>
- Keliang, G., & Dongzhi, W. (2006). Asymmetric oxidation by *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(2), 135–139. <http://doi.org/10.1007/s00253-005-0307-0>
- Kikani, B. a, Shukla, R. J., & Singh, S. P. (2010). Biocatalytic potential of thermophilic bacteria and actinomycetes. *Applied Microbiology*, 1000–1007.

- Lili, W., Jie, Q., Zhongce, H., Yuguo, Z., & Wei, H. (2006). Determination of dihydroxyacetone and glycerol in fermentation broth by pyrolytic methylation/gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 557(1-2), 262–266. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.030>
- Liu, Y. P., Sun, Y., Tan, C., Li, H., Zheng, X. J., Jin, K. Q., & Wang, G. (2013). Efficient production of dihydroxyacetone from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Gluconobacter frateurii*. *Bioresource Technology*, 142, 384–389. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.055>
- Liu, Z., Hu, Z., Zheng, Y., & Shen, Y. (2008). Optimization of cultivation conditions for the production of 1,3-dihydroxyacetone by *Pichia membranifaciens* using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 38(3), 285–291. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2007.07.015>
- Lo, H.-F., Chen, B.-E., Lin, M.-G., Chi, M.-C., Wang, T.-F., & Lin, L.-L. (2016). Gene expression and molecular characterization of a chaperone protein HtpG from *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 179–191. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.080>
- LUO, J., LI, H., ZHAO, N., WANG, F., & XIAO, F. (2015). Selective oxidation of glycerol to dihydroxyacetone over layer double hydroxide intercalated with sulfonato-salen metal complexes. *Journal of Fuel Chemistry and Technology*, 43(6), 677–683. [http://doi.org/10.1016/S1872-5813\(15\)30019-0](http://doi.org/10.1016/S1872-5813(15)30019-0)
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., & Wade, W. G. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 795–799.
- Mas, A., Torija, M. J., García-parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2014). Wine Vinegar. *The Scientific World Journal*, 2014(ID 394671), 1–7.
- Niehaus, F., Niehaus, F., Bertoldo, C., Bertoldo, C., Kähler, M., Kähler, M., ... Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(6), 711–729. <http://doi.org/10.1007/s002530051456>
- Paper, O. (2012). Production of dihydroxyacetone from an aqueous solution of glycerol in the reaction catalyzed by an immobilized cell preparation of acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans*, 1125–1132. <http://doi.org/10.1007/s00217-012-1846-0>
- Procedimientos, M. De. (2007). Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización.
- Rodríguez, J. B., Couto, D. A., & Szjanman, D. S. (2011). Química Orgánica II Guía de Trabajos Prácticos, 1–82.

- Sato, S., Morita, N., Kitamoto, D., Yakushi, T., Matsushita, K., & Habe, H. (2013). Change in product selectivity during the production of glyceric acid from glycerol by *Gluconobacter* strains in the presence of methanol, 1–7. <http://doi.org/10.1186/2191-0855-3-20>
- Schultz, E. L., de Souza, D. T., & Damaso, M. C. T. (2014). The glycerol biorefinery: a purpose for Brazilian biodiesel production. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 1(1), 1–9. <http://doi.org/10.1186/s40538-014-0007-z>
- Sellami-Kamoun, A., Haddar, A., Ali, N. E. H., Ghorbel-Frikha, B., Kanoun, S., & Nasri, M. (2008). Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiological Research*, 163(3), 299–306. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.001>
- Sproge, E., Chornaja, S., Dubencovs, K., Zhizhkun, S., Kampars, V., Serga, V., ... Palcevskis, E. (2013). Selective liquid phase oxidation of glycerol to glyceric acid over novel supported Pt catalysts. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78(9), 1359–1372. <http://doi.org/10.2298/JSC121203037S>
- Stasiak-Rzaska, L., Bazejak, S., & Gientka, I. (2014). Effect of glycerol and dihydroxyacetone concentrations in the culture medium on the growth of acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans* ATCC 621. *European Food Research and Technology*, 239(3), 453–461. <http://doi.org/10.1007/s00217-014-2238-4>
- Vicente, G., Coteron, a., & Martinez, M., Aracil, J. (1998). Application of the factorial design of experiments and response surface methodology to optimize biodiesel production. *Industrial Crops and Products*, 8(1), 29–35. [http://doi.org/10.1016/S0926-6690\(97\)10003-6](http://doi.org/10.1016/S0926-6690(97)10003-6)
- Words, K. (1995). High-Performance Liquid Chromatography of l)ihydroxyacetone as its bis-2,4-1)initrophenylhydrazone Derivative, 61–65.
- Yuan, Z., Gao, Z., & Xu, B. Q. (2015). Acid-base property of the supporting material controls the selectivity of Au catalyst for glycerol oxidation in base-free water. *Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis*, 36(9), 1543–1551. [http://doi.org/10.1016/S1872-2067\(15\)60936-6](http://doi.org/10.1016/S1872-2067(15)60936-6)
- Zapata, C. D., Martínez, I. D., Arenas, E., & Henao, C. A. (2007). Continuous biodiesel production from crude palm oil : Design and simulation of two continuous. *Dyna*, 151(1), 72.
- Zhang, Y., Dubé, M. A., McLean, D. D., & Kates, M. (2003). Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Bioresource Technology*, 89(1), 1–16. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00040-3](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00040-3)
- Zheng, X., Jin, K., Zhang, L., Wang, G., & Liu, Y. (2015). Effects of oxygen

transfer coefficient on dihydroxyacetone production from crude glycerol, 7, 129–135.

Graham Hill, John Holman Chemistry in Context 4^a edición Nelson Thornes, 2000, 629 páginas ISBN 0174482760, 9780174482765.