



Instituto Tecnológico de Costa Rica

Escuela de Biología

Ingeniería en Biotecnología



Proyecto de Investigación Estudiantil

“Establecimiento de un cultivo de *Gluconobacter oxydans* en un medio rico en glicerol para determinar la producción de DHA”

Estudiantes	Carné
Olman Madrigal Monge	200829917
Marlen Murillo Rojas	200868951
LuisMiguel Solano Carvajal	200818881

Profesor encargado

Fabiola Jiménez Rodríguez, *MSc.*

- I semestre, 2011 –

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	4
Palabras Clave:.....	4
INTRODUCCIÓN	5
Objetivo General	7
Objetivos Específicos	7
METODOLOGÍA.....	8
Equipo Utilizado	8
Medios de cultivo.....	8
Condiciones de cultivo en placa	8
Condiciones de conservación a largo plazo	8
Condiciones de fermentación.....	8
Evaluación de la producción de DHA por derivatización	9
Verificación de la producción de DHA por cromatografía de capa fina	9
Purificación de la DHA mediante recristalización.....	9
RESULTADOS	11
Establecimiento de la colonia	11
Fermentación	11
Derivatización.....	12
Purificación.....	14
DISCUSIÓN y CONCLUSIONES	16
AGRADECIMIENTOS.....	20
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
APÉNDICES	23
Apéndice 1	23
Apéndice 2	24
Apéndice 3	25
Apéndice 4	26
Apéndice 5	27
Apéndice 6	28
ANEXOS	29
Anexo 1.....	29

Anexo 2..... 30

“Establecimiento de un cultivo de *Gluconobacter oxydans* en un medio rico en glicerol para determinar la producción de DHA”

Olman Madrigal Monge¹

Marlen Murillo Rojas²

LuisMiguel Solano Carvajal³

MSc. Fabiola Jiménez Rodríguez⁴

RESUMEN

Gluconobacter oxydans es una bacteria Gram negativa capaz de transformar el glicerol en dihidroxiacetona (DHA), un compuesto de gran valor agregado usado como materia prima en la industria farmacéutica. Con el propósito de aprovechar un producto de desecho de la síntesis de biocombustibles como el glicerol, se establecieron las condiciones iniciales para la biotransformación de éste en DHA. Se siguió como objetivo establecer una colonia permanente usando medios de cultivo adecuados y verificar la producción de DHA en el medio de fermentación suplementado con glicerol. Se elaboraron tres medios distintos: uno para crecimiento, otro para mantenimiento de la bacteria y finalmente uno para la fermentación del glicerol y su transformación en DHA obteniéndose excelentes resultados en cuanto al crecimiento de la bacteria bajo todas las condiciones de cultivo probadas. Se utilizó la reacción de derivatización con el reactivo de Brady para determinar la producción de DHA en el medio GYP para fermentación, dándose la formación de un precipitado naranja característico de compuestos con cetona como grupo funcional, al cual se le determinó descomposición a los 300°C. Mediante una cromatografía de capa fina se separó el compuesto de interés de los demás componentes del medio GYP, se purificó por recristalización y se obtuvieron 16,9mg de un compuesto con las macropropiedades características de la DHA. Debido a que la sustancia aislada se hidrató es indispensable la realización de una prueba de espectroscopía infrarroja para poder identificarla correctamente y asegurar que la sustancia producida por *G. oxydans* en el medio GYP corresponde a DHA.

Palabras Clave:

Dihidroxiacetona (DHA), 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH), glicerina, fermentación, cromatografía, recristalización.

¹ Estudiante de Ingeniería en Biotecnología, Escuela de Biología, ITCR. Curridabat, Costa Rica. Estudiante Coordinador.

² Estudiante de Ingeniería en Biotecnología, Escuela de Biología, ITCR. Cartago, Costa Rica.

³ Estudiante de Ingeniería en Biotecnología, Escuela de Biología, ITCR. Cartago, Costa Rica.

⁴ Profesora Asesora. Escuela de Biología. ITCR. Cartago, Costa Rica

INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas el Biodiesel ha surgido como una fuente alternativa de energía dado que presenta una serie de ventajas en comparación con los combustibles tradicionales; entre ellas se denota una considerable disminución de los gases de efecto invernadero, menor contaminación del ambiente y una potenciación del sector agrícola a través de la expansión y aprovechamiento de los terrenos para cultivo (International Energy Agency, 2004). La producción de Biodiesel tiene como principal sub-producto la glicerina, compuesto que no ha recibido la atención adecuada pues cantidades muy bajas han sido utilizadas en la industria de jabón y otros productos cosméticos, mientras que la vasta mayoría del compuesto ha sido almacenado sin reconocer su verdadero potencial.

Es importante recalcar los múltiples beneficios que presentan los bioprocesos industriales. Se prefiere los procesos microbianos frente a los tradicionales (síntesis química) gracias a su naturaleza altamente específica, así como la relativa seguridad ambiental ya que los procesos químicos de formación de productos requieren medidas de seguridad más estrictas, dado que las reacciones involucradas son notablemente más peligrosas (Hekmat *et al.*, 2003). Un bioproceso de importancia para poder potenciar el uso del glicerol es la bioconversión en aras de iniciar con un producto de poco valor y fácil obtención (glicerina o glicerol) para luego transformarlo en otro compuesto con características valorables en el mercado (DHA), logrando un incremento considerable en su precio (Apéndice 1).

La propuesta planteada busca aprovechar la oxidación del carbono central de la glicerina mediante la bacteria *Gluconobacter oxydans*, cuyo producto es la cetona 1,3-dihidroxiopropan-2-ona, conocida en el mercado como DHA. En su forma pura, este compuesto químico se usa como un agente bronceador en lociones y su regulación no requiere de certificación (FDA, 2008); otra cualidad muy valiosa de la DHA radica en que esta sirve como base para la síntesis de varios compuesto de interés farmacéutico (Apéndice 2) como por ejemplo el metotrexato, el cual es empleado como un antimetabolito en el tratamiento contra el cáncer, así como para tratar la psoriasis y la artritis reumatoide (Medline Plus, 2009).

El microorganismo *Gluconobacter oxydans* (Apéndice 6) es una bacteria aerobia obligada Gram negativa (Gätgens *et al.*, 2007), que cuenta en su membrana con una enzima glicerol-deshidrogenasa (Gupta *et al.*, 2001). *G. oxydans* generalmente se encuentra aislada, en pares o rara vez formando cadenas, posee forma elipsoidal. Se ha reportado que esta bacteria no es patógena para los seres humanos o los animales; sin embargo, sí se reporta patogenicidad para algunas especies de plantas (Gätgens *et al.*, 2007).

Debido a la presencia de la enzima glicerol-deshidrogenasa en su membrana (Gupta *et al.*, 2001) (Anexo 1), esta bacteria es capaz de oxidar el carbono central de la glicerina. La glicerina o glicerol es un compuesto orgánico cuyo nombre IUPAC es propan-1,2,3-

triol, este compuesto constituye el principal subproducto del proceso de síntesis de Biodiesel. El producto de esta oxidación es la DHA (Hekmat *et al.*, 2003).

Además de la producción de DHA, *G. oxydans* presenta gran importancia biotecnológica debido a que es capaz de transformar D-sorbitol en L-sorbosa y ácido D-glucónico, ácido 5-ceto- y 2-cetoglucónico a partir de D-glucosa ya que la bacteria se adapta bien a medios con azúcar y alcohol (Gätgens *et al.*, 2007).

Es importante mencionar que para la identificación de presencia de cetonas y aldehídos en un medio, es posible emplear el reactivo de Brady (2,4-dinitrofenilhidrazina). Este compuesto reacciona formando una mezcla coloreada según el compuesto presente sea una cetona o un aldehído (Anexo 2). Lo anterior hace posible dejar en evidencia la presencia de DHA (compuesto cetónico) en el medio de cultivo. La reacción de derivatización lograda con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (formación de hidroxipirivaldehído-bis-2,4-dinitrofenilhidrazona y pirivaldehído-bis-2,4-dinitrofenilhidrazona) genera una coloración naranja (Ferioli *et al.*, 1995).

Dentro de un marco jurídico-ambiental, se plantea que debido a la utilización de un bioproceso en el que tanto los reactantes como el microorganismo (inocuo al ser humano) no representan una amenaza a la salud pública ni del ambiente, el proyecto propuesto no es antagónico a la normativa estipulada en el bloque de constitucionalidad pro ambiente. Este bloque contempla el derecho a un ambiente sano (derecho fundamental) derivado de los artículos 21, 50 y 89 de la Carta Magna de la República de Costa Rica (Ben Amar, 2002).

La creciente alza en el precio internacional del petróleo y las consecuencias ambientales que produce su uso, plantean la posibilidad de que en Costa Rica se sustituyan, aunque sea en forma parcial, estas importaciones.

Los biocombustibles se generan a partir de la biomasa (toda la materia animal y vegetal disponible y la mayoría de los desechos del agro); además se producen desechos que pueden ser transformados en energía a muy bajo costo. La experiencia ha demostrado que el uso de los biocombustibles promueve el desarrollo local de un combustible renovable que disminuye el uso del petróleo por medio de un sistema de producción sustentable. Lo anterior es benéfico para el ambiente dado que reduce la contaminación sin necesitar cambios costosos en los sistemas de transporte; es favorable para la economía ya que genera nuevas oportunidades comerciales para los productores y sus comunidades (International Energy Agency, 2004). Aunado a lo anterior, su contenido calórico es muy similar al de los combustibles fósiles (Roa, 2009), su rendimiento es similar, no posee azufre y puede mezclarse en cualquier proporción con el derivado del petróleo.

En Costa Rica importantes cantidades de glicerina son generadas como subproducto de la síntesis del Biodiesel, por lo tanto se cuenta con la materia prima para el proyecto a un precio accesible. Es claro que los beneficios económicos que conlleva la

biotransformación de la glicerina a DHA son considerables, puesto que se utiliza un supuesto producto de desecho para la producción de una sustancia que posee un precio varias veces superior.

Costa Rica tiene el potencial para producir biodiesel y de esta manera disminuir las importaciones de los derivados del petróleo. Si conjuntamente se desarrollan proyectos como el de la producción de DHA, en donde se pretende aprovechar y producir utilidades de mayor valor a partir de productos de desecho, los múltiples beneficios serían tanto para varios sectores de la industria como para el país en general.

Por otro lado, uno de los objetivos del Instituto Tecnológico de Costa Rica es el de promover el espíritu emprendedor tanto en la comunidad nacional como estudiantil y fomentar la creación de nuevas empresas. Mediante la presente propuesta se pretende impulsar a varios estudiantes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología al desarrollo de un proyecto que busca producir beneficios económicos y ambientales. Asimismo, al lograr el avance de esta iniciativa se podría fomentar la creación de una empresa dedicada a la biotransformación de diferentes productos, promoviendo así el uso de energías y tecnologías más limpias que beneficien al país.

El proyecto planteado se ejecutó dividiendo la metodología en tres partes: i) establecimiento de la colonia de trabajo; ii) fermentación del medio rico en glicerol y evaluación del crecimiento y iii) verificación cualitativa de la producción de DHA. Este esquema lógico se seleccionó por la simpleza de su ejecución, el tiempo disponible de los autores (dado que aún son estudiantes) y la disponibilidad de materiales y equipo.

Objetivo General

Establecer las condiciones para la producción de dihidroxiacetona (DHA) a partir de glicerina por medio de la bacteria *G. oxydans* con el fin de aprovechar un producto de desecho.

Objetivos Específicos

- i) Establecer una colonia permanente usando medio de cultivo MYP.
- ii) Verificar la producción de DHA en el medio de cultivo MYP suplementado con glicerol.

METODOLOGÍA

Equipo Utilizado

Durante el desarrollo del experimento se utilizaron los siguientes equipos:

- Centrífuga Eppendorf 5810R (Versión de 15 amp)
- Shaker Precision Scientific 360
- Cabina de flujo laminar (Esco Smart Control y Esco Class II Tipo A2)
- Incubadora (Barnstead Lab Line 159 e Imperial III Lab Line 564510)
- Congelador -70°C SANYO U5386SC

Medios de cultivo

Para la realización del presente proyecto se determinó la necesidad de contar con tres medios distintos:

1. Mantenimiento de la colonia (ATCC, 2010).
2. Crecimiento de la cepa en placa (Claret *et al.*, 1992).
3. Proceso de fermentación (GYP).

Cada uno con funciones diferentes según la etapa del proyecto de acuerdo con lo estudiado en la literatura (Claret *et al.*, 1992; Claret *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 2001; Hekmat *et al.*, 2003 y Gätgens *et al.*, 2007). Los componentes de cada medio están disponibles en el Apéndice 3. Estos medios se prepararon con agua bidestilada, y posteriormente se autoclavaron a 121°C por 15 minutos en ciclo húmedo.

Una vez preparados, se almacenaron en refrigeración (4°C) hasta su uso y por un tiempo no mayor a los 3 meses.

Condiciones de cultivo en placa

Se mantuvo los cultivos a una temperatura entre 27°C y 32°C según el laboratorio en que se dispusiera de espacio (Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigación en Biotecnología y Laboratorio de Microbiología, Escuela de Biología)

Condiciones de conservación a largo plazo

Se tomaron varias asadas de los cultivos en placa, se re-suspendieron en un volumen de 10mL de cultivo de fermentación (GYP) y se dejó en agitación *over-night*. Pasado este tiempo, se suplementó el medio de fermentación hasta lograr una relación 20% glicerol (agregando 155g/L) y se distribuyó en crioviales de 1mL para su conservación a -70°C.

Condiciones de fermentación

Erlenmeyers de 500mL con un volumen final de fermentación de 50mL. El inóculo se preparó en un Erlenmeyer de 50mL con 20mL del medio de fermentación y una asada del cultivo fresco proveniente de placa con medio de crecimiento, para posteriormente tomar 10mL como inóculo de fermentación para realizar los ensayos por duplicado.

Las mejores condiciones tanto de preparación del inóculo como de fermentación de la bacteria son una temperatura de 27°C, un pH de 6 y agitación constante (Claret *et al.*, 1992; Wethmar y Decker, 1999 y Gupta *et al.*, 2001).

Cada cultivo se realizó, por duplicado, un total de tres veces con el fin de asegurar repetibilidad y se realizaron cultivos en Caldo Nutritivo (CN) para obtener una comparación de crecimiento y poder probar el derivatizante. Los conteos se hicieron en un hematocitómetro Bright-Line.

Evaluación de la producción de DHA por derivatización

Una vez concluida la fermentación, se trasvasó la totalidad del medio de cultivo de ambos erlenmeyers (sin mezclarlos) a 4 tubos cónicos para centrífuga, cada uno con un volumen final de 25 mL. Estos tubos se centrifugaron a 5°C y 4000 rpm por 15 minutos. Se tomó el sobrenadante en cada caso y se guardó en tubos cónicos para centrífuga limpios.

La primer derivatización se efectuó como sigue: se colocó en un frasco transparente de tamaño adecuado debidamente procesado y se le añadió 0.1% v/v del reactivo de Brady. Se mezcló bien y se dejó reposar por 15 minutos. De igual forma se hizo con un blanco (medio de cultivo pre-fermentación) y con agua destilada para tener puntos de referencia en cuanto a cambios de coloración.

La segunda derivatización se efectuó por triplicado siguiendo el protocolo de Brady (diluir el medio de cultivo en una razón 1:1 de etanol al 95% y agregar reactivo en acceso según el cálculo de molaridad) (Apéndice 4).

El precipitado sólido obtenido se filtró del medio y se empleó para determinar el punto de fusión en el aparato de Fisher Johns.

Verificación de la producción de DHA por cromatografía de capa fina

Se tomó una muestra de 2mL del medio de cultivo GYP fermentado por *G. oxydans* y se colocó en tres placas cromatográficas de sílice con dimensiones de 9,5 x 7,5cm mediante la técnica de carga en línea con una pipeta Pasteur de punta cortada. Las placas se dejaron secar y fueron colocadas en una cámara cromatográfica (fase móvil: acetato de etilo y fase móvil: 1-propanol) hasta que el frente de elución estuviese a 1cm de distancia del extremo superior de la placa.

Posterior a la cromatografía, las placas se extrajeron de la cámara cromatográfica y se dejó evaporar el eluyente, se cortó un extremo de la placa paralelo al frente de la corrida y se sumergió en el agente derivatizante para determinar el desplazamiento del compuesto cetónico.

Purificación de la DHA mediante recristalización

Localizado el desplazamiento de la cetona, se procedió a cortar la sección de la placa correspondiente para la purificación de la DHA. Las secciones obtenidas de la placa

cromatográfica fueron cortadas en segmentos menores y depositados en un recipiente al cual se le agregó 15mL de acetato de etilo, se agitó con vigorosidad y se filtró con embudo y papel Whatman para uso general (este proceso se efectuó por triplicado). Los 45mL totales del filtrado fueron expuestos a un flujo de aire para la evaporación del compuesto volátil (acetato de etilo) y obtención del recristalizado correspondiente para efectuarle pruebas de identificación (espectroscopía infrarroja).

RESULTADOS

Establecimiento de la colonia

Se logró establecer una colonia de *Gluconobacter oxydans* en crecimiento activo en todos los medios de cultivo propuestos. Se verificó que en el medio de placas de la ATCC la cepa en uso alcanza un desarrollo satisfactorio (Figura 1) en un período de 2 días (48 horas); en el medio propuesto para mantenimiento Claret *et al.* (2001) el crecimiento fue más lento, tardando aproximadamente 5 días en alcanzar un desarrollo óptimo (Figura 1).

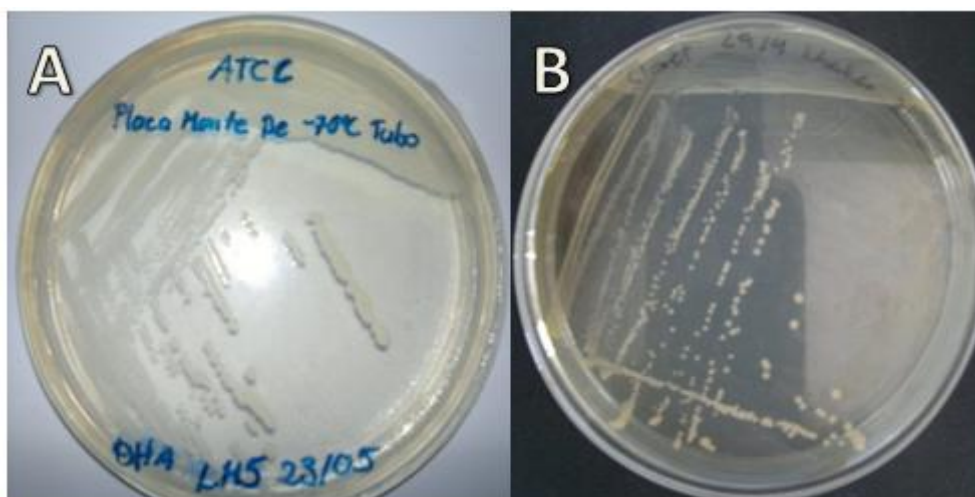


Figura 1. Crecimiento de las colonias bacterianas en los medios de cultivo propuestos.
A: ATCC a las 48 horas; B: Mantenimiento a los 5 días

Fermentación

El crecimiento en el medio líquido rico en glicerol (GYP) fue muy satisfactorio, logrando que en 12 horas de agitación el medio pasara de transparente a turbio (Figura 2), con una densidad bacteriana de $1,89 \times 10^8$ bacterias/mL. Luego de una fermentación de 14 días, se obtuvo una densidad de $5,38 \times 10^8$ bacterias/mL en GYP; en cuanto al Caldo Nutritivo (CN), se obtuvo una densidad microbiana de $2,44 \times 10^8$ bacterias/mL a partir del mismo inóculo que el GYP en el mismo periodo de tiempo.



Figura 2. Erlenmeyer con medio GYP luego de 14 días de fermentación.

Cabe destacar que de las tres fermentaciones realizadas, se presentó contaminación en la segunda prueba (Figura 3). Para determinar el agente causal, se procedió a re-aislar en placas (Agar Recuento Estándar, Agar Papa-Dextrosa, Medio ATCC y Medio de Crecimiento) y se determinó que se trataba de un hongo.

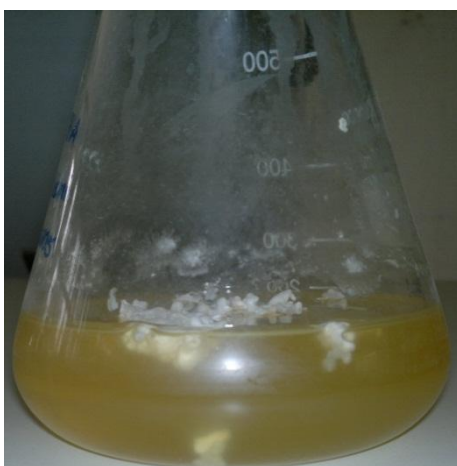


Figura 3. Erlenmeyer con medio de fermentación contaminado con un hongo.

Derivatización

A través de la prueba cualitativa realizada se obtuvo una identificación preliminar del compuesto DHA mediante la derivatización dada la coloración naranja (indicador de la presencia de cetonas) y la no precipitación inmediata del derivatizado. Esta no precipitación indica una cetona de muy bajo peso molecular pues la totalidad del compuesto formado permanecía en suspensión. Como prueba de verificación o control negativo, se preparó de la misma forma el caldo nutritivo (CN) luego de 14 días de crecimiento bacteriano, y quedó en evidencia la ausencia de reacción derivatizante (Figura 4).

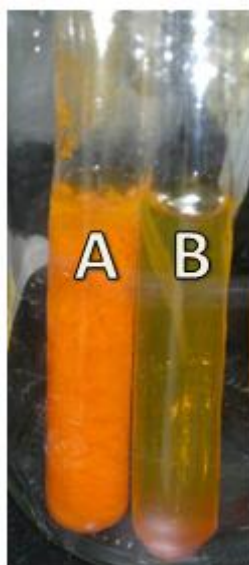


Figura 4. Comparación de la adición de agente derivatizante a dos caldos de cultivo distintos luego de 14 días de crecimiento bacteriano en condiciones idénticas. A: Tubo de ensayo con medio GYP; B: Tubo de ensayo con CN.

Lo mismo se efectuó al medio GYP antes de su fermentación, con el resultado de no derivatización evidente (en la Figura 5 se compara con el medio fermentado para efectos visuales).

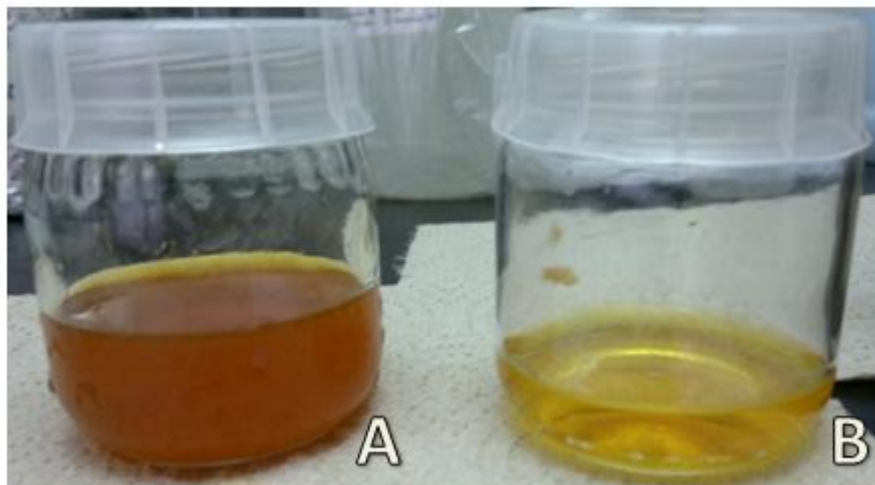


Figura 5. Derivatización de GYP post-fermentación (A) y pre-fermentación (B).

Se logró filtrar el derivatizado y obtener un sólido color naranja característico de una derivatización de cetona. Se realizó una prueba de punto de fusión pero el compuesto se descompuso al llegar a los 300°C (Figura 6).

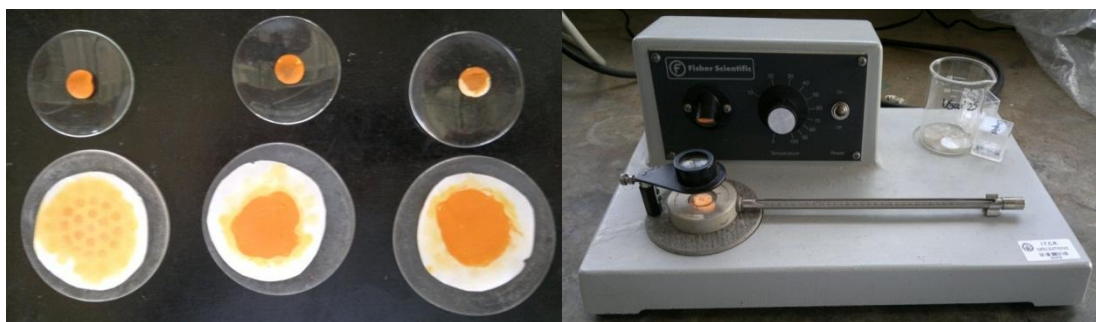


Figura 6. Sólido filtrado (izquierda) y proceso de determinación del punto de fusión en aparato de Fisher Johns (derecha)

Purificación

En la prueba cromatográfica, la placa de sílice permitió la separación de un compuesto cetónico tanto en fase móvil de acetato de etilo como en 1-propanol. Se dio una mejor resolución en acetato de etilo, pero el desplazamiento del compuesto resultó ser mayor en 1-propanol. La extracción orgánica (intentada en una relación de volumen 1:1 del medio de cultivo y acetato de etilo) fue poco eficiente en la cromatografía, por lo que se determinó como mejor forma de extracción la aplicación en fase acuosa directa. Como prueba de verificación, se realizó el mismo procedimiento con CN luego de 14 días de crecimiento bacteriano, y no se presentó ninguna indicación de reacción (Figura 7).

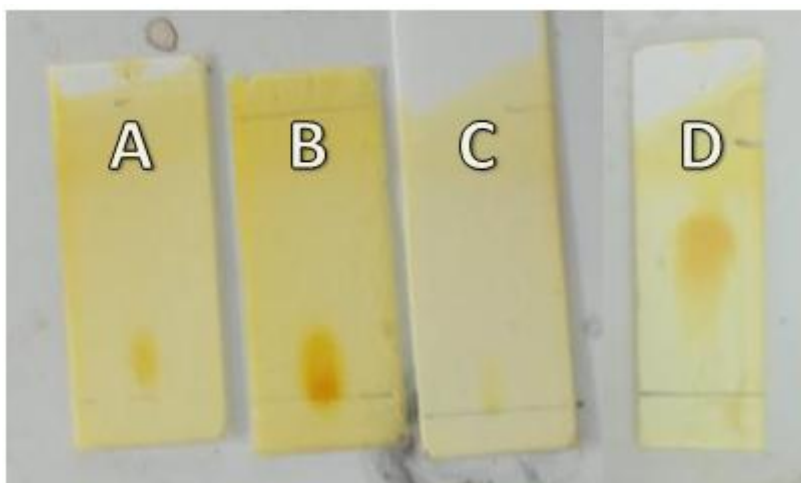


Figura 7. Pruebas cromatográficas con dos fases móviles distintas en distintos medios de extracción. A: Extracción de fase orgánica de GYP con fase móvil de acetato de etilo; B: Fase acuosa de GYP con fase móvil de acetato de etilo; C: CN con fase móvil de acetato de etilo; D: GYP con fase móvil de 1-propanol.

Para la purificación, se procedió con 1-propanol y placas cromatográficas de mayor tamaño. Una vez efectuada la elución en placa, se determinó la presencia del compuesto y se procedió con la purificación descrita en la metodología (Figura 8).

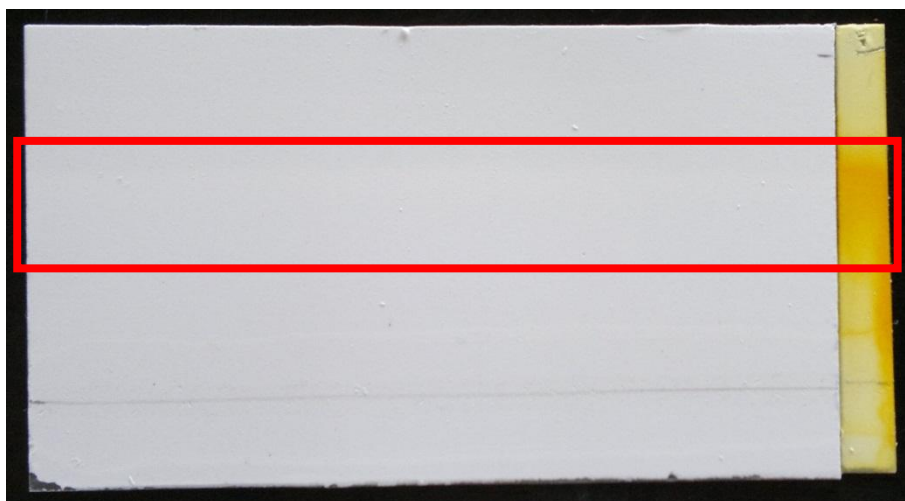


Figura 8. Placa cromatográfica empleada para la purificación. El segmento naranja a la derecha corresponde a la sección cortada y sumergida en el derivatizante; el rectángulo rojo indica la sección cortada y empleada en la recristalización del compuesto.

Mediante la técnica de purificación por recristalización, se logró obtener 16,9mg de un compuesto con las macropropiedades características de la DHA (Figura 9), sin embargo al momento de realizar un análisis de espectroscopía infrarroja para confirmar que el compuesto aislado efectivamente se tratara de DHA (24 horas luego de la extracción) este había sufrido hidratación (ver Apéndice 5 para resultados obtenidos) imposibilitando su análisis final.



Figura 9. Recristalizado obtenido

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

El establecimiento de *Gluconobacter oxydans* tanto en el medio de cultivo de crecimiento como en el medio de mantenimiento fue logrado gracias a la composición adecuada de ambos medios (Apéndice 3), los cuales al ser fuente de los nutrientes básicos para el crecimiento bacteriano (carbono, nitrógeno, fósforo y minerales) demuestran ser efectivos para lograr el crecimiento y sobrevivencia de la bacteria bajo las condiciones de laboratorio empleadas. Si bien es cierto, tanto en el medio de crecimiento como en el del mantenimiento se logró el establecimiento de la bacteria, esta presentó diferencias en cuanto al tamaño de las colonias, intensidad y tiempo de crecimiento debido a las variaciones en los componentes de ambos tipos de medio.

Las principales variantes en ambos medios son la fuente de carbono (manitol en el medio de crecimiento y extracto de levadura en el de mantenimiento), la presencia/ausencia de peptona y la adición de glicerol al medio de crecimiento. Aunque la bacteria, según los resultados obtenidos, muestra afinidad tanto hacia el uso de manitol como al extracto de levadura. Una razón de la diferencia del comportamiento de la bacteria en ambos medios se debe a que el medio de crecimiento posee peptona como fuente de nitrógeno y aminoácidos, nutriente ausente en el medio de mantenimiento, esto podría ser motivo del lento crecimiento en este último medio dado que la bacteria tiene menor disposición de uno de los nutrientes esenciales para la síntesis de proteínas y otras moléculas de importancia biológica.

A pesar de las diferencias en cuanto al crecimiento de la bacteria obtenidas, los resultados se hayan dentro de lo reportado anteriormente por otros autores ya que Claret *et al.* (1992) utilizaron el mismo medio de mantenimiento empleado en esta investigación para *G. oxydans*, mientras que Gupta *et al.* (2001) y Gätgens *et al.* (2007) usaron medios líquidos para el mantenimiento cuya fuente de carbono era el manitol.

En cuanto al tercer medio de cultivo elaborado (GYP), los resultados muestran un crecimiento bacteriano abundante, esto debido a la presencia de todos los nutrientes esenciales para el crecimiento celular. Lo anterior queda confirmado con la aparición de turbidez en el medio a las 12 horas de fermentación y con los conteos efectuados, que muestran una mayor cantidad de bacterias por mL de medio GYP en comparación con el CN. A pesar de que se obtuvo una densidad celular de $5,38 \times 10^8$ bacterias/mL en el medio de fermentación a los 14 días, este valor representa únicamente la cantidad total de células en suspensión, sin hacer diferencia entre células metabólicamente activas, en fase de latencia o en fase de muerte. Lo anterior se debe a la técnica de conteo empleada, en particular por el no uso de una tinción diferencial. Debido a la importancia para la investigación de contar con células vivas y viables capaces de transformar el glicerol en DHA, es imperativo para futuras investigaciones acudir a otro tipo de técnicas para conteo celular y para verificar la viabilidad de las células bacterianas (tinciones o microscopía de fluorescencia).

Las razones de la muerte celular durante la fermentación podrían atribuirse, a parte del proceso natural de deterioro en un cultivo, a una muerte acelerada por el sustrato (muerte provocada por la adaptación celular a nuevas condiciones de cultivo producto de un estrés metabólico) o a una inhibición de su crecimiento por la acumulación de elevadas concentraciones de DHA. Esto último ya que Claret *et al.* (1994) y Hekmat *et al.* (2003), mencionan que altas cantidades de este compuesto ejercen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacteria provocando un daño irreversible, que posteriormente ocasiona que el desarrollo celular y la oxidación del glicerol cesen por completo.

Hekmat *et al.* (2003), determinaron que los valores umbrales de concentración de DHA presente en el medio adecuados para seguir asegurando la supervivencia de la bacteria, no deben de sobrepasar los 60 kg.m^{-3} y que *G. oxydans* presenta tolerancia temporal a concentraciones entre 80 y 120 kg.m^{-3} de DHA antes de ser dañadas irreversiblemente, no se puede asegurar que la causa de la muerte en las fermentaciones realizadas se deba exclusivamente a esta razón, ya que el volumen de fermentación empleado en todos los casos (50ml) hace poco probable sobrepasar el valor umbral de tolerancia.

En cuanto a las condiciones experimentales establecidas para lograr el crecimiento de la bacteria en los medios sólidos, siempre se mantuvo una temperatura cercana a los 27°C , y en el caso del medio líquido de fermentación a pesar que Claret *et al.* (1992); Wethmar y Decker (1999) y Gupta *et al.* (2001) establecían las mejores condiciones de cultivo de la bacteria a una temperatura de 27°C y agitación constante de 150rpm, debido a las condiciones del agitador-calentador disponible, se pudo cumplir sólo con la temperatura pues la agitación no se indicaba en una unidad de medida sino por intensidad, por lo que se usó un criterio arbitrario de “intermedio”.

La manipulación de todos los medios de cultivo, así como de los inóculos de *G. oxydans* se efectuaron siempre bajo las más estrictas normas de trabajo aséptico que permitieron las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular del CIB y del Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Biología; la contaminación de un medio GYP de fermentación con un hongo pudo haberse debido a una mala manipulación de los erlenmeyers fuera de la cámara de transferencia o en el mismo agitador orbital, el cual se compartió durante algunas semanas con otros cultivos pertenecientes a otras investigaciones y proyectos efectuados por estudiantes y profesores de Biotecnología.

En lo que atañe a determinar la formación de DHA, es necesario primero hacer una separación del medio de cultivo y las células de la bacteria por simple centrifugación, lo que genera el precipitando las bacterias y permite que en el sobrenadante permanezca la DHA disuelta. La identificación de la DHA en el medio de cultivo fermentado requiere ser efectuada mediante la formación de un derivado la cual es técnica que, por facilidad de análisis y/o identificación, transforma el compuesto de interés en otro distinto del compuesto original mediante una reacción estequiométrica conocida (Apéndice 4). Para que esto se lleve a cabo generalmente se da un cambio de estado del derivado con

respecto a la sustancia inicial, siendo en el caso de la DHA disuelta en el medio GYP la formación de un sólido insoluble en suspensión o un precipitado de color naranja, indicador de la presencia de compuestos con grupos funcionales cetona.

La derivatización efectuada en esta investigación se basó en una reacción química conocida dada por la adición del reactivo de Brady al medio fermentado, este reactivo es 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) disuelta en ácido sulfúrico concentrado, etanol 95% y agua.

Así, al lograr la identificación del derivatizado con DNPH se determina que esta ha sido originada por la presencia de DHA en el medio fermentado por *G. oxydans* debido a que la DNPH ante DHA reacciona originando la formación de hidroxipirualdehído-bis-2,4-dinitrofenilhidrazona y pirualdehído-bis-2,4-dinitrofenilhidrazona (ver reacción química en Anexo 2), por lo que el medio se torna color naranja.

Como se menciona en la sección correspondiente a Resultados, para una identificación preliminar de la presencia de DHA, se procedió a comparar la reacción de derivatización entre el 2,4-DNPH y los medios GYP y CN una vez fermentados (utilizando el segundo como control negativo). Se evidenció cualitativamente esta reacción, ya que la coloración obtenida en el medio GYP fue contrastante con la ausencia de formación de derivatizado en el medio CN (Figura 4), esto debido a que a pesar del crecimiento abundante de la bacteria en este medio, al carecer de glicerol no se dio la oxidación a DHA propia del metabolismo de *G. oxydans*. De forma similar, se aprovechó este contraste en el medio GYP sin fermentar el cual, aunque sí tenía glicerol, al no haber sido inoculado aún no presentaba formación de algún compuesto cetónico.

Una vez obtenido el derivatizado (filtrado por vacío) se procedió a intentar determinar su punto de fusión, como una de las pruebas típicas de identificación de compuestos orgánicos. Al emplear el aparato de Fisher Johns se determinó que el compuesto se descompone a 300°C. No se encontró en la literatura un valor de fusión reportado para el derivatizado de DNPH con el compuesto cetónico presente en el medio contra el cual comparar, por lo que a partir de los resultados obtenidos se determinó que el derivatizado pierde sus propiedades físicas iniciales ya que al descomponerse cambió su coloración naranja a una color café oscuro.

Mediante la realización de una cromatografía de capa fina fue posible determinar la producción de un compuesto cetónico (posiblemente DHA) en el medio GYP fermentado. Al aplicar a una placa cromatográfica una pequeña muestra del medio y eluirlo en dos fases móviles diferentes se observó un mayor desplazamiento del compuesto en la cromatografía con fase móvil de 1-propanol debido a que este compuesto es más polar que el acetato de etilo, presentando mayor afinidad por el compuesto cetónico. La ausencia de corrida de algún compuesto derivatizable con DNPH en la cromatografía aplicada a la muestra de caldo nutritivo confirma que *G. oxydans* no produjo DHA ni ningún otro compuesto cetónico en el CN, esto debido a la

ausencia de glicerol en el medio corroborando los resultados discutidos anteriormente al aplicar agente derivatizante directamente sobre una muestra del CN fermentado por 14 días por la bacteria. Aunado a lo anterior, se realizó una extracción orgánica con acetato de etilo, sin embargo dada la alta solubilidad de la DHA (compuesto teóricamente presente en el medio) en agua (TAOS Chemical, 2010) resultó poco eficiente emplear este método.

Debido a la mayor afinidad del 1-propanol por el compuesto cetónico derivatizado se seleccionó este eluyente para la purificación. Se extrajo el compuesto de interés de las placas con acetato de etilo, logrando la purificación por recristalización obteniéndose 16,9mg de un compuesto con las mismas macrocaracterísticas de la DHA. Este recristalizado resultó ser higroscópico y, se especula que, también sufrió una posible descomposición debido a las condiciones de almacenaje y ambientales a las que se expuso durante las 24 horas posteriores a la extracción de las placas cromatográficas. Lo anterior derivó en la pérdida de sus propiedades físico-químicas iniciales, imposibilitando la confirmación del compuesto por espectroscopía infrarroja.

A partir de las pruebas microbiológicas efectuadas en esta investigación se logró establecer un cultivo de *Gluconobacter oxydans* en todos los medios probados siendo el medio de crecimiento ATCC el más efectivo para lograr un buen desarrollo microbiano en placa debido a sus características nutricionales. El medio líquido GYP mostró excelentes resultados como sustrato de fermentación de la bacteria ya que al contar con glicerol permitió la bioconversión de este producto de desecho en un compuesto cetónico (teóricamente DHA). La utilización de DNPH como agente derivatizante permitió la confirmación de la producción de una cetona en el medio fermentado, la cual se logró separar de los demás componentes del medio GYP mediante una cromatografía de placa fina con 1-propanol como el eluyente más afín con el compuesto analizado. Los análisis químicos hechos permitieron la purificación de 16,9mg de un compuesto macropropiedades físicas correspondientes con la DHA, no obstante es indispensable la realización de una prueba analítica de espectroscopía infrarroja para corroborar que el compuesto producido por *G. oxydans* en el medio GYP se trata efectivamente de DHA.

AGRADECIMIENTOS

La cepa ATCC 621 (tipo silvestre) de *G. oxydans* utilizada se obtuvo gracias a una donación de Technische Universität Hamburg-Harburg (TUHH) a la Escuela de Biología vía el investigador Ralf Pörtner, Ph.D. (TUHH). Se agradece al profesor Miguel Rojas, Ph.D., de la Escuela de Biología del ITCR la coordinación de la donación de la cepa y sus consideraciones positivas respecto al presente proyecto: *“La carrera de Ingeniería en Biotecnología siempre ha estimulado el espíritu emprendedor entre sus estudiantes, por lo que este proyecto es un reto considerable para los estudiantes proponentes dado que permitiría la conversión de un subproducto de la fabricación del biodiesel en un compuesto de mayor valor económico. Asimismo daría un impulso importante a la búsqueda de combustibles alternativos y energías renovables en el ITCR.”* Le agradecemos además por impulsarnos a concretar el proyecto, por gestionar muchas de las actividades y por ser lector del documento inicial.

Agradecemos el asesoramiento por parte de la profesora Floria Roa Gutiérrez, Ph.D., quien se desempeña en el campo de la química orgánica, especialmente en la síntesis de productos. Sus aportes resultaron de vital importancia durante la investigación en la fase experimental de extracción, separación, purificación e identificación del compuesto de interés (la DHA). Por su parte, la profesora quiso aportar el siguiente comentario: *“Los estudiantes que ejecutarán este proyecto han demostrado gran capacidad y entusiasmo por el desarrollo de la investigación propuesta. La temática de la producción biotecnológica de productos de mayor valor agregado a partir de la glicerina se acopla perfectamente con los ejes de conocimiento estratégicos tanto en el eje de energía, e industria como con los transversales de innovación, ambiente. Como profesora investigadora, supervisar a estudiantes como Olman, LuisMiguel, y Marlen representa una experiencia enriquecedora”*. No tenemos palabras para agradecerle a la profesora por todo lo que nos aportó desde un inicio de proyecto y por el tiempo que dedicó a nuestras dudas, consultas y trabajo en el laboratorio.

De la misma forma agradecemos a la profesora Fabiola Jiménez Rodríguez, MSc. por su interés brindado al proyecto y su valiosa colaboración como profesora tutora de la investigación.

No podemos olvidar el aporte de dos de nuestros compañeros, Ricardo Alvarado y Estefanía Vincenti quienes trabajaron con nosotros en la propuesta inicial y que, por motivos administrativos, no pudieron participar en la parte de ejecución pero que sin lugar a duda merecen el mismo crédito que nosotros por el aporte a la institución.

Agradecidos siempre,

Olman, Marlen y LuisMi.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATCC (2010). ATCC medium: 1 mannitol agar. Tomado de: <<https://www.atcc.org/Attachments/2289.pdf>> el 12 de Enero, 2010.
- Ben Amar, K. (2002). Un Bloque de Constitucionalidad Para la Protección del Ambiente. ambientales. DIC: 69-74.
- Claret, C., Salmon, J.M., Romieu, C. y Bories, A. (1994). Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. *Applied Microbiology Biotechnology*. 41: 359-365.
- Claret, C., Bories A. y Soucaille P. (1992). Glycerol Inhibition of Growth and Dihydroxyacetone Production by *Gluconobacter oxydans*. *Current Microbiology*. 25: 149-155.
- FDA (2002). Title 21--Food And Drugs: Chapter I--Food And Drug Administration (Department Of Health And Human Services), Subchapter A—General. Part 73 -- Listing Of Color Additives Exempt From Certification. Subpart B—Drugs: Sec. 73.1150 Dihydroxyacetone. Tomado de: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=73.1150>> el 13 de Julio, 2009.
- Feriolli, V., Vezzalini, F., Rustichelli, C. y Gamberini, G. (1995). High-Performance Liquid Chromatography of Dihydroxyacetone as its bis 2,4-Dinitrophenylhydrazone Derivate. *Chromatographia*. 41 (1): 61-65.
- Gätgens, C., Degner, U., Bringer-Meyer, S. y Herrmann, U. (2007). Biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76: 553-559.
- Gupta, A., Singh, V., Qazi, G.N. y Kumar, A. (2001). *Gluconobacter oxydans*: Its Biotechnological Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 3 (3): 445-456.
- Hekmat, D., Bauer, R. y Fricke, J. (2003). Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*. *Bioprocess, Biosystems and Engineering*. 26: 109-116.
- International Energy Agency. (2004). Biofuel for Transport: An International Perspective. Tomado de: <<http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2004/biofuels2004.pdf>> el 13 de Julio, 2009.

Medline Plus, USA National Institute of Health. (2009). Methotrexate. Tomado de: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a682019.html>> el 18 de Junio, 2009.

TAOS Chemical. (2010). DHA (1,2-dihydroxyacetone) Technical Data Sheet. Tomado de: <<http://www.taoschem.com>> el 3 de junio de 2011.

Wethmar, M. y Deckwer, W.D. (1999). Semisynthetic culture medium for growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnology Techniques*. 13: 283–287.

APÉNDICES

Apéndice 1

Cuadro 1. Proveedores de reactivos en distintos países y su respectiva oferta en el precio para la DHA y la glicerina.

Compañía	Producto	Pureza	Precio	Cantidad
ABCR (Germany)	DHA	96%, dímero	204.00 €	1 kg
http://www.abcr.de/	Glicerina	99%	61.40 €	2.5 L
Alfa Aesar (USA)	DHA	97%, dímero	\$224.00	1 kg
http://www.alfa.com/	Glicerina	99+%	\$70.00	1 L
Cole – Palmer (USA)	DHA	98%, dímero	\$125.00	0.500 kg
http://www.coleparmer.com/	Glicerina	99+%	\$67.50	1 L
Spectrum (USA)	DHA	--	\$337.70	1kg
http://www.spectrumchemical.com/	Glicerina	--	\$48.60	0.500 L

Apéndice 2

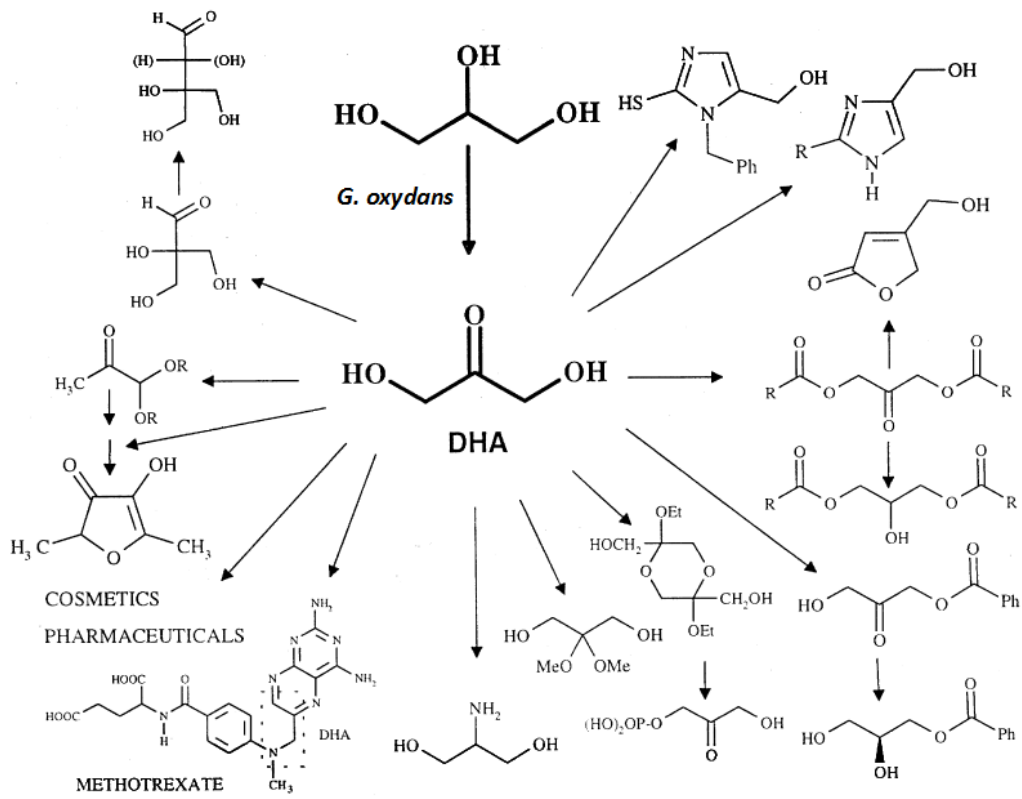


Figura 1. Derivados y sub-derivados de la DHA (modificado de Hekmat *et al.*, 2003)

Apéndice 3

Formulación de los medios de cultivo empleados

1) Medio de mantenimiento (ATCC)

- 25.0 g/L de manitol
- 3.0 g/L de peptona
- 5.0 g/L de levadura
- 15.0 g/L de agar

2) Medio de crecimiento en placa (Claret *et al.*, 1992)

- 20/L g de glicerina
- 10 g/L de extracto de levadura
- 20 g/L de agar

3) Medio de fermentación (GYP)

- 25 g/L de glicerol
- 5 g/L de extracto de levadura
- 3 g/L de peptona

Apéndice 4

Cuadro 2. Relación estequiométrica entre DHA y 2,4-DNPH

Compuesto	Masa molar (g/mol)	Masa esperada (g)	Moles	g/mL	mol/mL
DHA	90,07794	1,17500	0,01304	0,02350	0,00026
2,4-DNPH	198,13624	3,00000	0,01514	0,02857	0,00014
Razón					1,80918*

Elemento	Peso atómico	Átomos	2,4-DNPH	Átomos	DHA
C	12,0107	6	72,0642	3	36,0321
H	1,00794	6	6,0476	6	6,04764
N	14,0067	4	56,0268	0	0
O	15,9994	4	63,9976	3	47,9982
		Masa molar	198,1362	Total	90,07794

*Por lo tanto se debe agregar, a una alícuota de 2mL, un volumen de 3,61836mL de 2,4-DNPH.

Apéndice 5

Cuadro 3. Purificación del compuesto cetónico presente en 2 mL de medio de cultivo fermentado.

Placa	Área (cm ²)	Peso sin compuesto (mg)*	Peso con compuesto (mg)	Peso del compuesto (mg)
#1	14,175	519,5	545,7	26,2
#3	13,950	511,3	535,5	24,2

*Peso de cm²/placa sin compuesto: 36,65mg.

Compuesto cetónico purificado:

Peso del vial: 21,8956g

Peso vial + compuesto: 21,9025g

- Total compuesto cetónico purificado:

$$21,9025\text{g} - 21,8956\text{g} = 0,0169\text{g}$$

- Cantidad de compuesto por mililitro de medio fermentado:

$$16,9\text{mg compuesto}/2\text{mL medio} = 8,45\text{mg/mL}$$

Apéndice 6

DESCRIPCIÓN DE LA CEPA

Cepa: *Gluconobacter oxydans* (Henneberg 1897) De Ley 1961 emend. Gosselé et al. 1983 emend. Mason and Claus 1989

La cepa de *G. oxydans* a adquirir proviene de la colección alemana de microorganismos DSMZ, según su sitio web, la cepa DSM 50049 a emplearse en el proyecto es también conocida como *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* (Henneberg 1898) De Ley and Frateur 1974, *Gluconobacter oxydans* subsp. *melanogenes* (Beijerinck 1911) De Ley and Frateur 1974, *Gluconobacter oxydans* subsp. *oxydans* (Henneberg 1897) De Ley 1961 y *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* (Kluyver and de Leeuw 1924) De Ley and Frateur 1974. El mismo microorganismo puede ser encontrado en otras colecciones bajo los siguientes números de accesoión: ATCC 621, CIP 104737, NCIB 7069, NRRL B-72.

La DSMZ recomienda el medio 105 para su crecimiento el cual está compuesto de la siguiente forma: 100.0g/L de glucosa, 10.0g/L de extracto de levadura, 20.0g/L de CaCO₃ y 15,0g/L de agar a pH de 6.8.

El microorganismo es suministrado como un cultivo liofilizado y pertenece al grupo de riesgo tipo 1 (DMSZ, 2010). La ATCC (2010) reporta que los organismos que pertenecen al grupo de riesgo 1, según el Centro para el Control y prevención Enfermedades de los Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés), presentan un riesgo mínimo para seres humanos adultos saludables (Center for Disease Control and Prevention y National Institutes of Health, 2007).

Su precio a octubre de 2010 es de €50 para instituciones sin fines de lucro y de €65 para otro tipo de instancias.

ANEXOS

Anexo 1

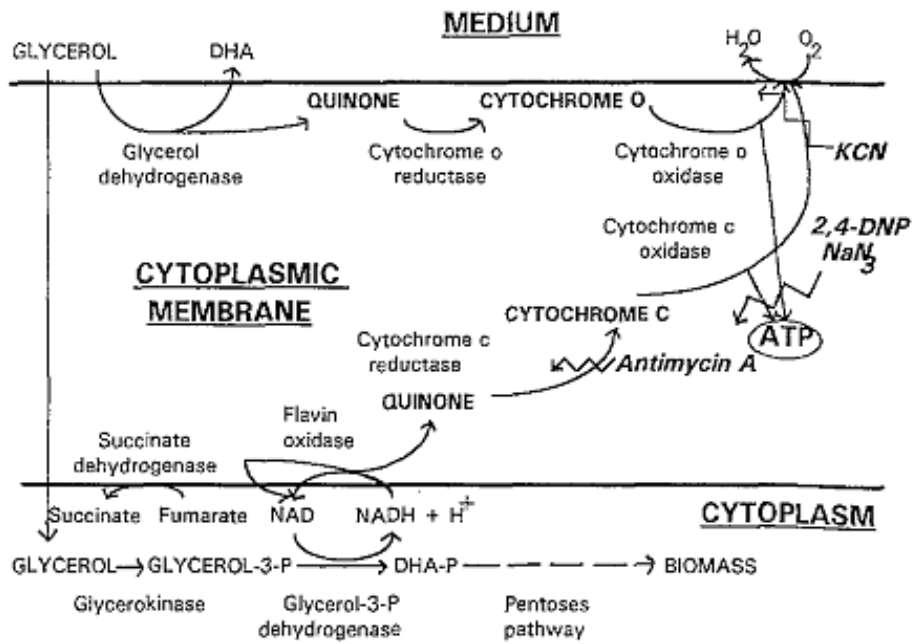


Fig. 4. Metabolic pathways used for glycerol conversion by *G. oxydans*: DHA-P, dihydroxyacetone phosphate

Anexo 2

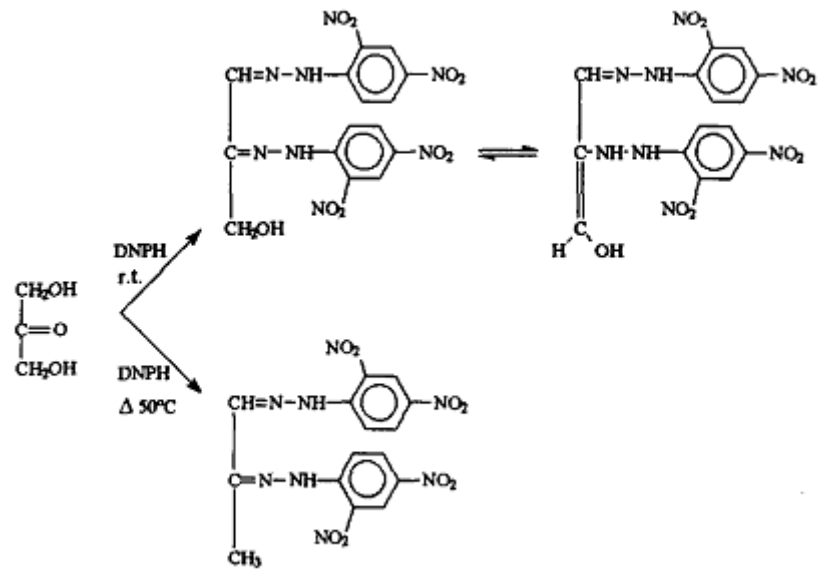


Figura 1. Reacción de derivatización de DHA en presencia de DNPH bajo condiciones normales y a 50°C (Ferioli *et al.*, 1995).