

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

**Producción de compuestos de interés
biotecnológico por células en reposo de una
cepa termotolerante de *Gluconobacter***

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Andrés Vigo (239801)

Santiago Bonasso (243537)

Tutora: MSc. Magdalena Ripoll

2024

Declaración de autoría

Nosotros, Andrés Vigo y Santiago Bonasso, declaramos que el trabajo que se presenta en esta obra es de nuestra propia mano.

Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el Trabajo Final de Carrera;
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotros;

Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Andrés Vigo



Santiago Bonasso

12 de agosto de 2024

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer especialmente a nuestra tutora, MSc. Magdalena Ripoll, por el apoyo, paciencia y buena disposición brindados durante todo este proyecto, además de presentarnos la idea del mismo.

A la Dra. Lorena Betancor, por la oportunidad de integrarnos a su grupo de investigación y por estar siempre al tanto de nuestro proyecto.

A todas las personas del Laboratorio de Biotecnología la Universidad ORT Uruguay y el Centro Biotecnológico de Investigación e Innovación, en especial al Lic. Nicolás Soriano, que nos ayudó con los análisis de muestras por HPLC y a la Dra. Ana Paula Mulet, que nos apoyó en el diseño de la metodología de PCR. Además, agradecerle al MSc. Carlos Sanguinetti y a los docentes de la carrera por acompañarnos durante todo este proceso, tanto en nuestra formación académica como en nuestro crecimiento como personas.

A nuestros compañeros y amigos de carrera, que hicieron más amena nuestra etapa en la Universidad, y que en cada ocasión, nos brindaban su apoyo y buenas energías para seguir adelante.

A nuestros padres, familiares y amigos, por el apoyo incondicional en esta etapa y a lo largo de toda la carrera.

Resumen

Gluconobacter es un género de bacterias de gran relevancia industrial debido a su capacidad para oxidar azúcares y alcoholes en compuestos de valor agregado. Entre los productos obtenidos por estas bacterias, destacan la dihidroxiacetona (DHA), el ácido glicérico (GA) y el ácido glucónico (AGlu), derivados de la oxidación del glicerol y la glucosa. Estos sustratos, presentes en grandes cantidades en residuos industriales como el glicerol crudo de la industria del biodiésel o la biomasa lignocelulósica de la industria agrícola-forestal, tienen bajo valor de mercado y su descarte repercute en la contaminación ambiental. En contraste, los productos oxidados obtenidos mediante *Gluconobacter* tienen mayor relevancia industrial y valor de mercado, siendo la DHA demandada por la industria cosmética, el GA por sus aplicaciones en síntesis química, y el AGlu utilizado en las industrias alimentaria, farmacéutica y cementera. Por ello, la valorización de residuos industriales a través de biotransformaciones con *Gluconobacter* es un área en constante desarrollo.

En esta Tesis, se exploró la capacidad de la cepa termotolerante *Gluconobacter sp.* CHM43 (GCHM43) para oxidar glicerol y glucosa utilizando células en reposo. Las cepas termotolerantes pueden crecer a temperaturas más altas y presentan ventajas de operación a nivel industrial. Por su parte, las células en reposo permiten llevar a cabo eficientemente conversiones más limpias, facilitando la reducción de los costos de purificación.

El crecimiento de GCHM43 se estudió a 30 y 37°C, confirmando su capacidad para crecer a ambas temperaturas, aunque con diferencias en la velocidad de crecimiento y la densidad óptica (DO_{600nm}) final alcanzada. Los mejores rendimientos de biomasa fueron obtenidos a 30°C ($DO_{600nm} = 3,54 \pm 0,04$). Los ensayos con células en reposo, en los cuales se estudió el impacto de una variedad de parámetros operativos, demostraron la capacidad de GCHM43 de oxidar tanto la glucosa como el glicerol en estas condiciones, con mejores resultados observados a 30°C. La máxima concentración de AGlu obtenida a escala de matraces fue $22,7 \pm 1,8$ g/L, mientras que para el caso de la DHA y el GA fue $11,2 \pm 0,1$ g/L y $24,4 \pm 0,3$ g/L, respectivamente.

Aunque la conversión de glicerol por esta cepa ya había sido ensayada a 30°C con células en crecimiento, hasta este trabajo no existían estudios sobre su conversión a altas temperaturas ni

con células en reposo. Por su parte, la oxidación de glucosa por GCHM43 no había sido explorada en ninguna condición operativa hasta este trabajo.

Palabras clave

Ácido glucónico, Dihidroxiacetona, Ácido glicérico, Glicerol, Glucosa, Biotransformación, *Gluconobacter*, Termotolerancia, Células en reposo

Abreviaturas

GCHM43: *Gluconobacter sp.* CHM43

GA: Ácido glicérico

DHA: Dihidroxiacetona

AGlu: Ácido Glucónico

BAA: Bacterias del Ácido Acético

PQQ: Pirroloquinolina quinona

HPLC: Por sus siglas en inglés, *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia)

RID: Por sus siglas en inglés, *Refractive Index Detector* (Detector de Índice de Refracción)

PDA: Por sus siglas en inglés, *Photodiode Array Detector* (Detector de Arreglo de Fotodiodos)

G. oxydans: *Gluconobacter oxydans*

G. frateurii: *Gluconobacter frateurii*

DO_{600nm}: Densidad óptica a medida a 600 nm

pb: Pares de bases

PCR: Por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*

ARNr: Acido ribonucleico ribosomal

rpm: Revoluciones por minuto

Tret: Tiempo de retención

MPM: Marcador de peso molecular

mGDH: Glucosa deshidrogenasa de membrana

mADH: Alcohol deshidrogenasa de membrana

mALDH: Aldehído deshidrogenasa de membrana

mGLDH: Glicerol deshidrogenasa de membrana

mGADH: Gluconato deshidrogenasa de membrana

m2KGDH: 2-ketogluconato deshidrogenasa de membrana

5-KGA: Ácido 5-ketoglucónico

2-KGA: Ácido 2-ketoglucónico

2,5-KGA: Ácido 2,5-diketoglucónico

Cyt c: Citocromo c

FAD: Flavina adenina dinucleótido

Índice

Declaración de autoría.....	2
Agradecimientos.....	3
Resumen	4
Palabras clave.....	6
Abreviaturas	7
Índice.....	9
1. Introducción	12
1.1. Las biotransformaciones	12
1.2. El género <i>Gluconobacter</i>	14
1.3. <i>Gluconobacter</i> sp. CHM43, una cepa termotolerante con perspectivas de aplicación industrial.....	15
1.4. Biotransformaciones de glucosa.....	16
1.5. Biotransformaciones de glicerol.....	19
2. Objetivos	24
2.1. Objetivo general	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
3. Metodología	25
3.1. Materiales	25
3.1.1. Material Biológico.....	25
3.1.2. Reactivos generales	25
3.2. Métodos.....	25
3.2.1. Reactivación de la cepa y ensayos preliminares de crecimiento.....	25
3.2.2. Estudio de la morfología por tinción de Gram.....	26
3.2.3. Prueba de la catalasa	26
3.2.4. Curvas de crecimiento a diferentes temperaturas.....	26
3.2.5 Identificación de la cepa por PCR.....	27
3.2.6. Obtención de curva de peso seco	28

3.2.8. Biotransformaciones en placa	29
3.2.8.1 Generación de inóculos de GCHM43 para reacciones de biotransformación .	29
3.2.8.2. Estudio del efecto de la fase de crecimiento de las células en reposo en las biotransformaciones	29
3.2.8.3. Estudio del efecto de la concentración de células en las biotransformaciones	30
3.2.8.4. Estudio del efecto de la concentración de sustrato en las biotransformaciones	30
3.2.9. Biotransformaciones a escala de matraces	30
3.2.10. Cuantificación por HPLC.....	31
4. Resultados y discusión	32
4.1. Estudios de caracterización e identificación de GCHM43.....	33
4.1.1. Estudio de la morfología de GCHM43	34
4.1.2. Prueba de la catalasa	36
4.1.3. Estudio del crecimiento a distintas temperaturas	37
4.1.4. Identificación de GCHM43 por PCR.....	39
4.1.4.1. Diseño de cebadores.....	40
4.1.4.2. Amplificación por PCR de un fragmento del gen del ARNr 16S de GCHM43	43
4.2 Estudios de crecimiento a escala de matraces	44
4.2.1. Estudios de crecimiento a distintas temperaturas.....	46
4.2.2. Obtención de curva de peso seco	48
4.3. Biotransformaciones utilizando células en reposo de CHM43	50
4.3.1. Biotransformaciones de glucosa.....	51
4.3.1.1. Desarrollo de un método de detección para glucosa y AGlu por HPLC.....	51
4.3.1.2. Estudio del efecto de la fase de crecimiento en el que se recolectan las células en la biotransformación de glucosa.....	57
4.3.1.3. Estudio del efecto de la concentración bacteriana en la biotransformación de glucosa.....	63
4.3.1.4. Estudio del efecto de la concentración inicial de sustrato en la biotransformación de glucosa.....	65
4.3.1.5. Biotransformación de glucosa a escala de matraces	70
4.3.2. Biotransformaciones de glicerol.....	72

4.3.2.1. Estudio del efecto de la fase de crecimiento en el que se recolectan las células en la biotransformación de glicerol	73
4.3.2.2. Estudio del efecto de la concentración de células en la biotransformación de glicerol.....	76
4.3.2.3. Estudio del efecto de la concentración inicial de sustrato en la biotransformación de glicerol.....	78
4.3.1.5. Biotransformación de glicerol a escala de matraces	82
5. Análisis económico	85
6. Conclusiones	85
7. Referencias bibliográficas	89
8. Anexos.....	99

1. Introducción

1.1. Las biotransformaciones

El aumento global de la población en los últimos años ha tenido un impacto directo en la economía, incrementando la demanda de alimentos, combustibles y otros productos. Como resultado, los requerimientos de recursos naturales han aumentado, al igual que los desechos generados, lo que produce un impacto negativo en el medio ambiente (1). Por estas razones, existe una necesidad de desarrollar una química más limpia y sostenible, considerando la naturaleza finita de algunos recursos y la necesidad de utilizarlos de manera eficiente (2).

Las biotransformaciones representan una alternativa ecológica a las conversiones químicas tradicionales. Estas incluyen todas las reacciones químicas catalizadas por enzimas aisladas o células enteras (3). Procesos de este tipo han sido utilizados por la humanidad durante miles de años, y aún hoy en día, el número de aplicaciones en el campo de las biotransformaciones continúa en aumento (4). De este modo, las biotransformaciones se han convertido en una herramienta valiosa tanto en la industria como en la academia (5).

Los procesos de biotransformación son beneficiosos porque colaboran con el establecimiento de las biorrefinerías. Las biorrefinerías, son definidas como instalaciones que utilizan procesos biológicos para transformar biomasa (incluyendo residuos), en productos de valor agregado (6). La posibilidad de establecimiento de estas contribuye a la economía circular de una industria, aprovechando los residuos y promoviendo además una gestión más eficiente y ecológica, para generar productos con un impacto ambiental reducido.

Los biocatalizadores utilizados en este tipo de reacciones son enzimas aisladas o células enteras de distintos orígenes. Esto supone una ventaja frente a las reacciones catalizadas químicamente, debido a que se trata de procesos más “verdes”, siendo que los catalizadores son obtenidos de fuentes renovables y sus condiciones óptimas de operación tienden a ser temperaturas y pH suaves, empleando medios acuosos (7). Con respecto al uso de enzimas aisladas, una de sus principales desventajas es la alta susceptibilidad que presentan las mismas a los cambios en su entorno, perdiendo fácilmente su actividad. Esto puede influir significativamente en la productividad de los procesos biocatalizados. Asimismo, los costos asociados a los procesos de

aislamiento y purificación de las mismas previos a su utilización las hace en oportunidades costosas de obtener (8). Por su parte, el uso de microorganismos enteros para la realización de los procesos de biotransformación es una alternativa interesante al uso de enzimas aisladas. La posibilidad de llevar a cabo procesos multienzimáticos es una de sus principales ventajas, ya que dentro de una misma célula pueden coexistir varias enzimas de una misma vía (9). Asimismo, el uso de células enteras ofrece a las enzimas presentes en el microorganismo sus condiciones de reacción naturales, permitiendo disminuir las pérdidas de actividad.

Las biotransformaciones con células enteras de microorganismo presentan distintas estrategias de implementación. Una de ellas es utilizar las células en crecimiento como biocatalizadores en las reacciones. Este método generalmente presenta buenas productividades, pero se ve acompañado de una serie de desventajas. A modo de ejemplo, la necesidad de un medio completo para el crecimiento no solamente genera contaminación del producto final por el agregado de sus componentes, sino que genera la ocurrencia de reacciones secundarias no deseadas (9), cuyos productos también contaminan el producto final.

Alternativamente, es posible utilizar las células enteras como células en reposo. Este tipo de células no se encuentran en crecimiento, pero están metabólicamente activas, presentando un gran potencial para su uso en biotransformaciones debido a que no requieren gastar su energía en la producción de biomasa. Aunque las células en reposo en ocasiones tienen una actividad más baja que las células en crecimiento y un nivel de reutilización que puede ser bajo, su manejo resulta más sencillo. Esto se debe a que el crecimiento de estos biocatalizadores está separado de su implementación como tales. Es decir, en una primera etapa las células crecen en un medio de cultivo complejo hasta alcanzar las concentraciones de biomasa requeridas, para posteriormente ser lavadas, eliminando contaminantes generados durante el crecimiento y otros nutrientes (10). En una segunda etapa, las células limpias pueden ser utilizadas como catalizadores en suspensión en un medio de reacción menos complejo. Mientras que la técnica aséptica es necesaria durante el crecimiento de las células, una vez cosechadas se pueden utilizar sin esterilidad. En otras palabras, son más fáciles de manipular y almacenar, lo que mejora la logística y la escalabilidad del proceso.

Asimismo, durante la biotransformación las células en reposo proporcionan condiciones más consistentes debido a su metabolismo más lento y estable, requiriendo generalmente menos nutrientes y oxígeno, lo que reduce los costos operativos. También minimizan la producción de

metabolitos secundarios y subproductos no deseados, lo que simplifica la purificación del producto final (10). La obtención de medios de reacción más limpios permite además reducir significativamente los costos asociados a la etapa de purificación, conocida también como procesamiento *downstream*, que según las estimaciones suele alcanzar alrededor de un 80% del proceso productivo (11).

Con estos beneficios, el uso de células en reposo para biotransformaciones supone una alternativa interesante con resultados comprobados.

1.2. El género *Gluconobacter*

Las bacterias del ácido acético (BAA) son un grupo de microorganismos Gram negativos de forma cilíndrica o elipsoidal, aerobios obligados (utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena de respiración celular), que juegan un papel fundamental en la producción de compuestos oxidados de relevancia (12). Estas bacterias pertenecen a la familia *Acetobacteraceae* dentro de la clase *Alphaproteobacteria*. Los géneros más representativos incluyen *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Komagataeibacter* y *Gluconacetobacter*, entre otros. En particular, el género *Gluconobacter* es bien conocido por su capacidad de oxidar incompletamente una amplia gama de azúcares y alcoholes de azúcar, con aplicaciones en la obtención de compuestos de interés industrial.

Estas oxidaciones son llevadas a cabo por un gran número de enzimas alcohol y aldehído deshidrogenasas asociadas a membrana, en un proceso denominado fermentación oxidativa. La fermentación oxidativa se refiere a la capacidad que tienen las bacterias del género *Gluconobacter* de obtener energía a partir de la oxidación incompleta de ciertos sustratos en presencia de oxígeno, acoplando estas oxidaciones a la cadena de transporte de electrones asociada a la respiración celular (13). Las enzimas involucradas están ancladas en la membrana citoplasmática con su sitio activo orientado hacia el periplasma, por lo que los sustratos no necesitan ingresar al citoplasma para ser oxidados, siendo luego los productos expulsados al medio celular donde se acumulan. Entre estas enzimas, se encuentran las responsables de la oxidación de glucosa, fructosa, sorbitol y glicerol, utilizando mayoritariamente el cofactor pirroloquinolina quinona (PQQ) para dicha función (14). Sin embargo, también hay enzimas de membrana dependientes de FAD y otras de molibdopterina. Actualmente, la mayoría de estas

enzimas ya ha sido reportada, y tanto su funcionamiento como sus estructuras han sido estudiados (15).

Los productos obtenidos a partir de las reacciones de fermentación oxidativa, como se mencionó anteriormente, se acumulan en el medio de cultivo. Esta característica hace de las bacterias del género *Gluconobacter* biocatalizadores de célula entera ideales, ya que la secreción de los productos al medio facilita su posterior purificación. Por esta razón es que bacterias de este género son ampliamente utilizadas para la producción de compuestos valiosos como la dihidroxiacetona (DHA), el ácido glicérico (GA) y el ácido glucónico (AGlu), lo que hace que *Gluconobacter* sea especialmente útil para aplicaciones industriales.

1.3. *Gluconobacter* sp. CHM43, una cepa termotolerante con perspectivas de aplicación industrial

Gluconobacter sp. CHM43 (GCHM43) es una cepa termotolerante de *Gluconobacter* que ha sido objeto de estudio por su capacidad para crecer y realizar procesos de fermentación oxidativa a altas temperaturas. Generalmente, las bacterias del ácido acético son mesófilas, con una temperatura óptima de crecimiento alrededor de los 30 °C (16). Tanto el crecimiento como la conversión de sustratos disminuyen drásticamente a temperaturas más altas, y usualmente no se observa crecimiento a temperaturas superiores a 34 °C. Sin embargo, las cepas termotolerantes pueden continuar creciendo a 37 °C, y algunas incluso pueden crecer a temperaturas de hasta 42 °C. Esta cepa, inicialmente identificada como *G. frateurii* pero luego reclasificada como *Gluconobacter* sp., fue aislada junto con otras cepas del género *Gluconobacter* a partir de diversas frutas y flores de Tailandia y Japón en el año 2000, por Moonmangmee et al (17). En particular, GCHM43 fue aislada de la fruta *Momordica charantia*, conocida como melón amargo. Durante el aislamiento, los autores destacaron su capacidad termotolerante al demostrar su crecimiento y capacidad de conversión de una serie de sustratos a 37 °C.

En la implementación de procesos industriales, el uso de cepas termotolerantes como GCHM43 representa una alternativa altamente beneficiosa, ya que son menos susceptibles a los aumentos de temperatura frecuentemente observados durante este tipo de procesos (18). A medida que los procesos de crecimiento o conversión se escalan en fermentadores, el aumento de la

temperatura asociado con este tipo de operaciones puede volverse crítico, lo que exige un control estricto de este parámetro para garantizar condiciones óptimas. El uso de cepas termotolerantes facilita la gestión de estas variaciones térmicas, asegurando un funcionamiento eficiente y estable, pudiendo disminuir pérdidas en la productividad debido a posibles fluctuaciones en la temperatura de operación. Asimismo, la posibilidad de llevar a cabo los procesos de crecimiento y conversión a mayores temperaturas puede potencialmente mejorar los rendimientos obtenidos. Esto se debe a que un aumento en la temperatura de una reacción biocatalizada generalmente tiene un impacto positivo en su velocidad, mientras se encuentre dentro del rango de operación del biocatalizador.

En particular, a pesar de haber sido descrita y caracterizada hace varios años, la cepa GCHM43 presenta escasos reportes de aplicación en biotransformaciones de célula entera en comparación con otras cepas de este género bacteriano. Sin embargo, su potencial queda demostrado a partir de la variedad de productos obtenidos en estos trabajos, que incluyen por ejemplo la L-sorbosa (19), la DHA (16), el GA (16), la 5-ketofructosa (20) y la L-eritrosa (21). De todas formas, cabe destacar que su capacidad de conversión de sustratos a altas temperaturas no ha sido evaluada en la mayoría de los casos, siendo que la mayoría de estos estudios fueron llevados a cabo a 30°C. En ese entendido, aún resulta pertinente estudiar el comportamiento de este biocatalizador en la oxidación de una variedad de sustratos a mayores temperaturas. Por otro lado, entre estos reportes existe un antecedente de aplicación de células en reposo de esta cepa para la oxidación de meso-eritritol (21). Esto resulta interesante para continuar explorando el potencial de biotransformación de GCHM43 en estas condiciones, dado que como se mencionó con anterioridad, el uso de células en reposo tiene una variedad de ventajas de cara a una aplicación industrial.

En base a lo presentado anteriormente, es que surge el interés de continuar con el estudio de la cepa GCHM43 como potencial biocatalizador de aplicación industrial. En particular, el foco de esta tesis estará en el uso de GCHM43 en reposo para la biotransformación del glicerol, un subproducto abundante de la industria del biodiésel, y la glucosa, un componente frecuente en descartes de la industria forestal.

1.4. Biotransformaciones de glucosa

La glucosa ($C_6H_{12}O_6$), es un azúcar que juega un papel crucial en la bioquímica de todos los seres vivos. Es el producto principal de la fotosíntesis y un intermediario clave en la respiración celular. Es un monosacárido fundamental en los procesos metabólicos de una amplia variedad de organismos, actuando como principal combustible metabólico para la mayoría de ellos (22). Su abundancia hace de este compuesto un componente frecuente en los descartes de una variedad de industrias.

En particular, los residuos lignocelulósicos, subproductos abundantes de industrias agrícolas y forestales, están compuestos principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina (23). La celulosa, una cadena de glucosa, es una fuente rica de este azúcar cuando se descompone mediante procesos de hidrólisis. La glucosa liberada puede ser biotransformada en productos de alto valor añadido, incluyendo ácidos orgánicos y azúcares funcionales. La valorización de estos residuos a través de biotransformaciones no solo reduce el impacto ambiental al disminuir la cantidad de desechos, sino que también promueve la economía circular y la sostenibilidad, convirtiendo los residuos en recursos valiosos y fomentando el desarrollo de tecnologías verdes (Figura 1) (23).

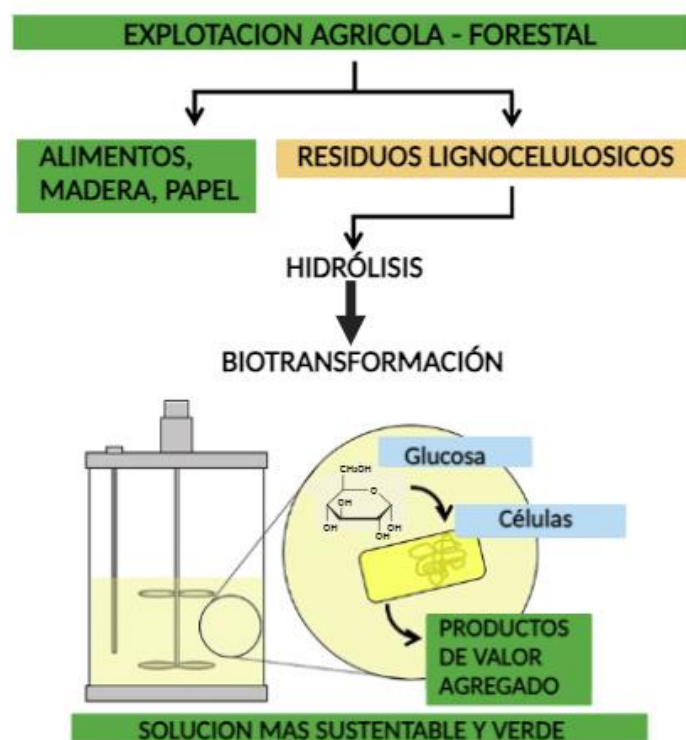


Figura 1. Representación esquemática de la obtención de productos de valor agregado empleando biotransformaciones a partir de los residuos lignocelulósicos obtenido en la industria agrícola-forestal. Adaptado de Ripoll & Betancor (24).

Un producto frecuente de la oxidación de la glucosa es el AGlu ($C_6H_{12}O_7$). Este compuesto es ampliamente reconocido por sus diversas aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, y de productos de limpieza, debido a sus propiedades quelantes y antimicrobianas (25). La transformación biotecnológica de glucosa en AGlu representa un avance significativo tanto en términos económicos como medioambientales. Una comparación del costo de 100 mg de estándares calidad farmacopea americana (USP) de cada uno de los compuestos permite ilustrar claramente esta diferencia. Mientras que el precio de 100 mg de un estándar USP de D-glucosa es de aproximadamente 113 USD, el precio de 100 mg de una sal del ácido glucónico de la misma calidad ronda los 243 USD (Fuente: Sigma Aldrich). Esta notable diferencia en el precio evidencia el potencial de la biotransformación para aumentar significativamente el valor de los residuos lignocelulósicos.

La producción biotecnológica de AGlu se lleva a cabo principalmente mediante procesos que emplean microorganismos del género *Gluconobacter* y *Gluconacetobacter* (26). Estos microorganismos son capaces de realizar la biotransformación de glucosa de manera eficiente y sostenible. La acción de la enzima glucosa deshidrogenasa, que oxida la glucosa en presencia del cofactor pirroloquinolina quinona (PQQ), es fundamental en este proceso (Figura 2).

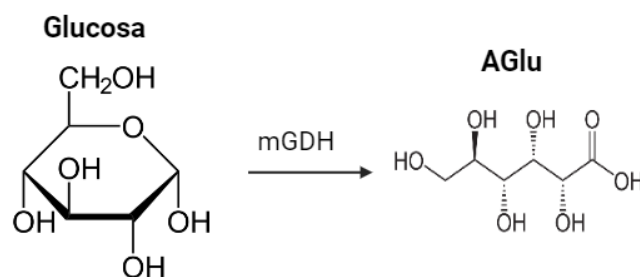


Figura 2. Vía para la conversión de Glucosa a AGlu, por acción de la enzima glucosa Deshidrogenasa (mGDH). Basado en lo visto en el estudio realizado por Zhou et al (27).

En particular, las bacterias del género *Gluconobacter* han sido utilizadas en numerosos reportes para la obtención de AGlu a partir de esta reacción. Ejemplos de este tipo de reportes se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Antecedentes de conversión de glucosa a AGlu por cepas de *Gluconobacter*.

Cepa de <i>Gluconobacter</i>	Metodología	[Glucosa] de partida (g/L)	[AGlu] obtenida (g/L)	Productividad (g/Lh)	Ref.
<i>G. oxydans</i> 621H	Fermentador de 3L, batch	100	94,2	5,9	Zhou et al., 2018 (28)
<i>G. oxydans</i> NL71	Matraces de 250 mL, con células en crecimiento	80	80,3	8,9	Zhang et al., 2023 (29)
<i>G. oxydans</i> 621H	Matraces de 250 mL con células en crecimiento	80	76,3	8,5	Zhou et al., 2019 (30)
<i>G. oxydans</i> NL71	Fermentador, libres en crecimiento, batch	100	98,3	26,5	Dai et al., 2023 (31)
<i>G. oxydans</i> 621H	Matraces de 250 mL con células en crecimiento	180	181,3	10,1	Dai et al., 2022 (32)

Este método de producción no solo proporciona una vía sostenible para la obtención de AGlu, sino que también abre nuevas posibilidades para su aplicación en productos innovadores y procesos industriales más ecológicos. La eficiencia del proceso biotecnológico y su alineación con los principios de la economía circular y la sostenibilidad global lo posicionan como una estrategia clave para la producción de compuestos de alto valor añadido a partir de recursos renovables. En consecuencia, la biotransformación no solo contribuye al incremento del valor económico de la glucosa, sino que también promueve prácticas industriales más respetuosas con el medio ambiente (33).

1.5. Biotransformaciones de glicerol

El glicerol (1,2,3-propanotriol), también llamado glicerina, es un alcohol trihidrato soluble en agua, incoloro e inodoro, con una alta viscosidad y un bajo punto de ebullición. Presenta propiedades antimicrobianas, emolientes, humectantes, y plastificantes (34)3). Es un producto

versátil que puede convertirse en una variedad de productos valiosos mediante reacciones como la deshidratación, condensación, transesterificación, reformado, hidrogenólisis, esterificación, oxidación, halogenación y esterificación (35).

Actualmente, la principal fuente de generación de este compuesto es la industria del biodiésel, donde anualmente se generan grandes cantidades de glicerol crudo como subproducto, representando un desafío industrial y ambiental. Este glicerol crudo, altamente contaminado por remanentes de la síntesis del biocombustible, se obtiene en una proporción de 1 kg de glicerol crudo por cada cada 10 kg de biodiésel producido (36). Debido a su baja pureza y limitada demanda, este glicerol se comercializa a un bajo precio (0,04 \$/ litro (37) principalmente para su quema en calderas industriales o como suplemento para la alimentación de rumiantes. Sin embargo, los grandes volúmenes remanentes de este subproducto son descartados a partir de su incineración, lo que genera problemas de contaminación. Esta problemática se ha intensificado en los últimos años con el crecimiento acelerado de la industria del biodiésel debido al agotamiento de los recursos fósiles (38). Por su parte, dado que los procesos de purificación de glicerol crudo son muy costosos, existe a nivel mundial un creciente interés en la utilización directa de este residuo. Es así como las biotransformaciones de este subproducto surgen como una alternativa más sustentable y redituable para su gestión, pudiendo generar productos de alto valor agregado a partir del mismo (Figura 3).

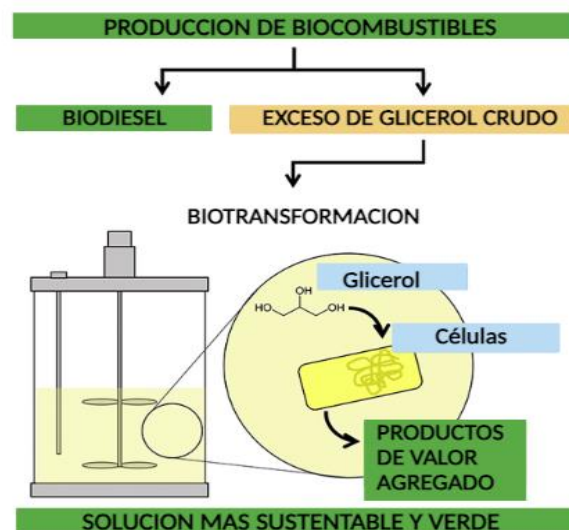


Figura 3. Representación esquemática de la obtención de productos de valor agregado empleando biotransformaciones a partir del glicerol crudo obtenido en la industria del biodiesel. Adaptado de Ripoll & Betancor (24).

En particular, existen varios antecedentes de bacterias del género *Gluconobacter* en los que se ha empleado glicerol crudo de la industria del biodiesel para la obtención de compuestos de valor agregado, como la DHA y el GA. En la Tabla 2 se observan ejemplos de estos reportes.

Tabla 2. Antecedentes de conversión de glicerol a DHA y GA por cepas de *Gluconobacter*.

Cepa de <i>Gluconobacter</i>	Metodología	[glicerol] de partida (g/L)	[DHA] obtenida (g/L)	[GA] obtenida (g/L)	Productividad (g/L. h)	Ref.
<i>G. oxydans</i> MTCC 904	Batch, inmovilizado, 30 °C	20	17,8	-	0,2	Dikshit et al., 2017 (39)
<i>G. frauterii</i> NBRC 103465	En reposo, matraz agitado, fed-batch	25	24,4	4,2	0,03 para GA y 2,07 para DHA	Jackson et al. 2019 (40)
<i>G. frauterii</i> CGMCC 5397	Libres en crecimiento fed-batch, 30L, reactor	60	58,8	-	0,7	Zheng et al. 2016 (41)
<i>G. oxydans</i> NBRC 14819	Batch, inmovilizado, 30 °C	50	20,2	-	0,85	Ripoll et al., 2021 (42)
<i>G. oxydans</i> MTCC 904	Matraces agitados, con células libres, batch	50 (con agregado de 10 g/L cada 48 h)	35,9	-	0,4	Dikshit et al., 2019 (43)

La DHA (1,3-dihidroxi-2-propanona, $C_3H_6O_3$) es una cetotriosa que se obtiene como producto de la oxidación del glicerol. Es un polvo blanco, higroscópico con sabor dulce y refrescante, que se utiliza ampliamente como agente bronceador en cosméticos y tienen potencial como bloque de síntesis química (44). Desde el punto de vista económico, la producción de DHA a partir de glicerol incrementa sensiblemente su valor. Esto se puede evidenciar al realizar una comparación del valor de mercado de 100 mg de estándares calidad USP de ambos compuestos. Mientras que 100 mg de un estándar calidad USP de glicerol tiene un valor aproximado de 20

USD, 100 mg de un estándar de DHA de la misma calidad tiene un valor de 164 USD (Fuente: Sigma Aldrich).

La síntesis biotecnológica de este compuesto consiste principalmente en la oxidación parcial de glicerol a DHA por bacterias del género *Gluconobacter* como *G. oxydans*, *G. frauterii* o *G. melanogenus* (44). El mecanismo de acción microbiano para la conversión de glicerol a DHA (Figura 4) involucra una oxidación incompleta por parte de la enzima glicerol deshidrogenasa (mGLDH) dependiente de PQQ. La misma se encarga de transferir electrones provenientes del sustrato al aceptor final de electrones, que es el oxígeno, durante la oxidación fermentativa, detallada anteriormente en esta Introducción.

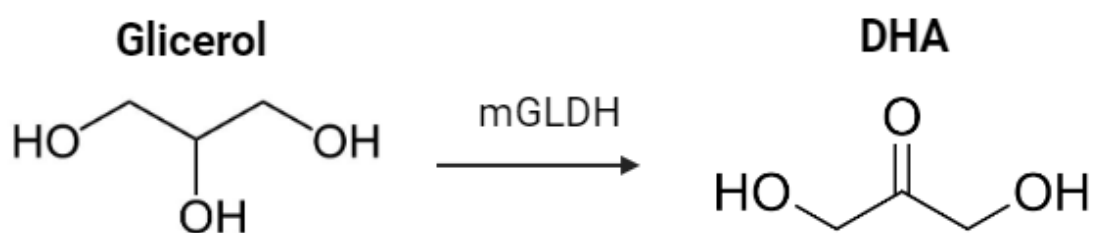


Figura 4. Vía para la conversión de glicerol a DHA, por acción de la enzima glicerol deshidrogenasa (mGLDH). Adaptado de de Jackson et al (27).

Por otro lado, el GA (ácido 2,3-dihidroxiopropanoico, $C_3H_6O_4$) es un compuesto químico natural que se encuentra en los organismos vivos, donde actúa como un metabolito intermedio en la vía glicolítica (45). El GA presenta un interés considerable debido a sus propiedades químicas y biológicas. Este compuesto quiral posee un alto valor como bloque en síntesis química, mientras que una serie de estudios ha confirmado su actividad biológica, lo que lo convierte en un candidato prometedor para la industria farmacéutica (46). Al igual que en el caso de la dihidroxiacetona, la producción de GA a partir de glicerol representa un aumento sustancial en el valor por gramo del producto obtenido. Al momento de escribir esta Tesis, no existen en el mercado estándares de GA con calidad USP que permitan una comparación precisa con el precio del glicerol. No obstante, según los valores disponibles para sales racémicas y enantioméricamente puras de este ácido con purezas superiores al 98%, 100 mg de una sal de DL-GA tiene un valor de mercado de 72 USD, mientras que 100 mg de una sal enantioméricamente pura de D-GA alcanzan los 164 USD (Fuente: Sigma Aldrich). Es importante destacar que, a pesar de tener una pureza inferior, ambas versiones de las sales de

GA tienen un valor por 100 mg superior al de un estándar de glicerol de calidad USP (20 USD). Esto evidencia el significativo aumento en el valor de mercado que supone la obtención de GA a partir de glicerol.

Para la producción biotecnológica del GA, se ha investigado la oxidación aeróbica del glicerol utilizando bacterias del ácido acético, particularmente del género *Gluconobacter*. Durante este proceso, la conversión del glicerol en GA se realiza en dos etapas diferenciadas, empleando dos enzimas de membrana distintas (Figura 5). En la primera etapa, el glicerol se convierte en gliceraldehído mediante la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa de membrana (mADH), que depende de PQQ. A continuación, el gliceraldehído es rápidamente transformado en GA por la enzima aldehído deshidrogenasa de membrana (mALDH), la cual depende de molibdopterina (47).

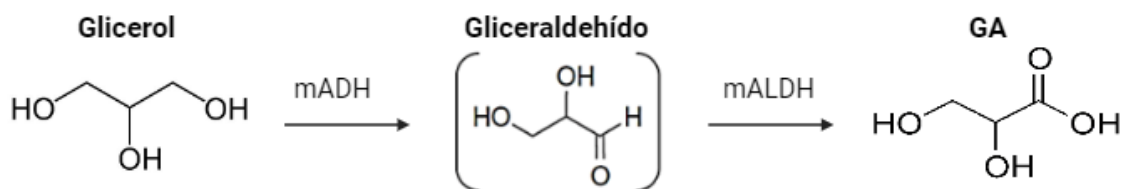


Figura 5. Vía para la conversión de Glicerol a GA. Adaptado de Jackson et al (27).

La producción eficiente tanto de DHA como de GA mediante biotransformaciones microbianas de este tipo ofrece una opción biotecnológica para llevar a cabo la revalorización sostenible del glicerol crudo producto de la industria del biodiésel.

Por lo anteriormente mencionado en esta Introducción, durante este trabajo final de carrera se buscó evaluar el potencial de la cepa termotolerante GCHM43 para llevar a cabo la biotransformación de sustratos de relevancia industrial, utilizando células en reposo como estrategia catalítica. El desarrollo de procesos sostenibles de valorización de residuos, con potencial de aplicación industrial, resulta fundamental para promover la economía circular, reducir el impacto ambiental y mejorar la eficiencia en el uso de recursos en diversos sectores industriales.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es obtener productos de alto valor agregado a partir de glicerol y glucosa, sustratos de relevancia industrial, utilizando células en reposo de la cepa *Gluconobacter sp. CHM43* (GCHM43).

2.2. Objetivos específicos

- Obtener altas concentraciones de catalizador a partir del desarrollo de un protocolo de crecimiento de GCHM43.
- Determinar la correlación entre la densidad óptica y la concentración de bacterias a partir de la construcción de una curva de peso seco.
- Cuantificar glucosa y AGlu a partir del desarrollo de una técnica de análisis por HPLC.
- Facilitar la evaluación de pureza en inóculos y reacciones a partir del desarrollo de una técnica para la identificación molecular de GCHM43 por PCR.
- Obtener altas concentraciones de los productos de interés a partir del estudio de la influencia de distintos parámetros (temperatura, concentración de bacteria, concentración de sustrato, tiempo de reacción, volumen) en la conversión de glucosa y glicerol por células en reposo.

3. Metodología

3.1. Materiales

3.1.1. Material Biológico

La ampolla conteniendo la cepa liofilizada de *Gluconobacter sp.* CHM43, fue obtenida del *National Institute of Technology and Evaluation* (NITE) (Tokio, Japón).

3.1.2. Reactivos generales

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico. La D-Glucosa, fue adquirida de *Carlo Erba Reagents* (Val-de-Reuil, Francia). El extracto de levadura, la peptona y el agar fueron obtenidos de *Oxoid* (Basingstoke, Reino Unido). El glicerol fue adquirido de *J.T. Baker* (Pensilvania, EEUU). El ácido AGlu fue obtenido de *Sigma Aldrich* (Missouri, EEUU). La Taq polimerasa *NZYTaq II DNA polymerase*, fue obtenida de *NZYtech* (Lisboa, Portugal), y los dNTPs fueron suministrados por *New England Biolabs* (Massachusetts, EEUU). Los cebadores fueron obtenidos de *Macrogen* (Seúl, Corea del Sur). La columna de *HPLC Rezex RHM-Monosaccharide H +* fue obtenida de *Phenomenex* (California, EEUU). El kit de extracción *Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit* fue obtenido de *Zymo Research* (California, EEUU)

3.2. Métodos

3.2.1. Reactivación de la cepa y ensayos preliminares de crecimiento

Se preparó el medio de crecimiento (20 g/L glicerol, 5 g/L glucosa, 10 g/L peptona y 10 g/L extracto de levadura), en adelante medio GG, en base al medio ΔP descrito por Habe et al., (19) . Para preparar medio GG sólido se agregó 15 g/L agar (medio GG agar). Posterior a su preparación, el medio fue autoclavado. Se procedió con la apertura de la ampolla y generación del stock. Para ello se resuspendió la cepa liofilizada en 15 mL de medio GG líquido. Se tomaron 625 μL de esta suspensión y se mezclaron con 375 μL de glicerol 80% estéril para una

concentración final de glicerol del 30% de los criotubos para almacenar a -80°C . Para los ensayos preliminares de crecimiento se inocularon tubos que contenían 3 mL de medio GG con 200 μL de la suspensión bacteriana, y se incubaron en un agitador orbital a 30 o 37°C a 200 rpm por 24 h. Esta prueba se realizó por triplicado. Para los ensayos preliminares de crecimiento en placas, se realizó una siembra en superficie con la suspensión generada de la ampolla y se incubó la placa obtenida en la estufa a 37°C , por 24 h. Esta prueba se realizó por triplicado.

3.2.2. Estudio de la morfología por tinción de Gram

Se llevó a cabo una tinción de Gram a partir de una colonia aislada de GCHM43, para evaluar la pureza de la cepa reactivada y verificar su morfología. Se siguió un protocolo, de acuerdo a lo descrito por la técnica de Hucker. Una vez obtenidos los preparados, se dejaron secar y se observaron al microscopio con un objetivo de 100x utilizando aceite de inmersión.

3.2.3. Prueba de la catalasa

Se tomaron colonias aisladas de GCHM43, las cuales se esparcieron ligeramente sobre una placa de vidrio. Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre la muestra y se observó la reacción.

3.2.4. Estudios de crecimiento a escala de matraces

Se realizaron precultivos a partir de colonias aisladas de GCHM43 inoculando 3 mL de medio GG, y se incubaron en un agitador orbital a 30 o 37°C a 200 rpm por 24 h. Se prepararon 3 matraces de 1 L con 250 mL de medio GG. Posterior a su preparación, los medios fueron autoclavados. Se inocularon los matraces a partir de los precultivos antes mencionados para partir con una densidad óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 0,1. Se incubaron a 30 o 37°C , en un agitador orbital a 200 rpm. Se tomaron muestras periódicamente a lo largo de 24 h para analizar la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ en un espectrofotómetro *Shimadzu UVmini 1240* de Shimadzu (Kyoto, Japón), donde previamente se midió un blanco con una alícuota del medio GG. Con las medidas obtenidas, se realizaron las curvas de crecimiento para ambas condiciones en el programa Prism V 8.0.1 de *GraphPad* (California, EEUU).

3.2.5. Identificación de la cepa por PCR

Se realizó la búsqueda del genoma completo y del gen de la subunidad 16S de GCHM43. Se generó un juego de cebadores específicos (Tabla 3), para amplificar una parte del gen 16S utilizando los programas ofrecidos en el NCBI

Tabla 3. Set de cebadores para amplificar una región del gen del ARNr 16S de GCHM43.

Nombre	Secuencia (5' - 3')
16S GCHM43 F BV	GGCAGCAGTGGGGAATATTG
16S GCHM43 R BV	CCACAACCCTCTCTCGAACT

Una vez obtenidas las secuencias de los cebadores específicos, se realizó una evaluación en *Oligo Analyzer* de IDT (Iowa, EEUU), con el fin de evaluar las propiedades de los cebadores, así como también su estabilidad, hibridación y potencial de formación de estructuras secundarias.

Se realizó una PCR con la enzima *NZYTaq II DNA polymerase*, de acuerdo con lo propuesto por el fabricante (Tabla 3). La mezcla reactiva y las condiciones de ciclado se detallan en las Tablas 4 y 5. Se utilizó una suspensión de ADN genómico purificado. Esta última suspensión se obtuvo a partir de una extracción del ADN genómico de GCHM43, utilizando el kit *Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep*, a partir de un precultivo crecido en medio GG.

Tabla 4. Componentes necesarios para la mezcla de PCR (25 μ L) para amplificar una región del gen del ARNr 16S de GCHM43.

Mix de reacción de PCR	Volumen (μ L)
Buffer de Reacción 10X	2,5
MgCl ₂ 50 mM	1,25
Mix dNTPs (2,5 μ M)	2
ADN polimerasa	1
Cebador sentido	0,6

Cebador antisentido	0,6
Agua libre de nucleasas	16,05
ADN molde	1

Tabla 5. Condiciones del ciclado para la PCR para amplificar una región del gen del ARNr 16S de GCHM43.

Evento	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	35
Annealing	54°C	30 s	
Extensión	72°C	20 s	
Extensión final	72°C	3 min	1

El producto se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, utilizando buffer TAE 0,5x tanto para la preparación de geles como para la corrida. Una vez finalizada la corrida, el resultado se visualizó utilizando un transiluminador.

3.2.6. Obtención de curva de peso seco

Se realizaron precultivos de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.2.4. A partir de estos precultivos se inocularon 4 matraces de 1 L, que contenían 250 mL de medio GG, para obtener una densidad óptica inicial del cultivo de 0,1. Posterior a la inoculación con los precultivos, se incubaron en un agitador orbital a 30°C y 200 rpm, hasta alcanzar la DO_{600nm} máxima. Se tomaron tubos de 50 mL, previamente pesados. Se realizaron diluciones del cultivo concentrado para obtener suspensiones con valores de DO_{600 nm} en un rango de 0,2 - 3,2. El cálculo de la cantidad de suspensión necesaria para la generación de la curva, se llevó a cabo utilizando la ecuación 1:

$$DO_{600nm\ inicial} \cdot V_{inicial} = DO_{600nm\ final} \cdot V_{final} \quad (1)$$

Donde $DO_{600\text{ nm}}$ inicial, es la $DO_{600\text{ nm}}$ máxima, $DO_{600\text{ nm}}$ es la $DO_{600\text{ nm}}$ que se quiere obtener y V_{final} es 50 mL. V_{inicial} , es el valor a calcular, que equivale a cantidad de suspensión necesaria por tubo.

La $DO_{600\text{ nm}}$ de las suspensiones obtenidas se midió en el espectrofotómetro *Shimadzu UVmini 1240* de *Shimadzu* (Kyoto, Japón) (diluyendo de ser necesario). Una vez determinados los valores de $DO_{600\text{ nm}}$, se centrifugaron 100 mL de cada suspensión a 4°C y 5000 rpm en dos ciclos de 50 mL. Luego de cada centrifugación se descartó el sobrenadante. Los pellets obtenidos se dejaron en la estufa a 60°C por 48 h. Una vez secos se pesaron en la balanza y se calculó la diferencia con el peso inicial del tubo para obtener el peso del pellet bacteriano. Los datos obtenidos fueron utilizados para obtener un gráfico de $DO_{600\text{ nm}}$ vs Biomasa (g/L) empleando el programa *Prism* de *GraphPad* (California, EEUU).

3.2.7. Biotransformaciones en placa

3.2.7.1 Generación de inóculos de GCHM43 para reacciones de biotransformación

Los inóculos para las conversiones se obtuvieron a partir de la generación de precultivos de GCHM43 de acuerdo a lo detallado en la sección 3.2.6. Con los precultivos se inocularon matraces de 1 L con 250 mL de medio de cultivo GG, partiendo de una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,1. Los cuales se dejaron crecer 16 h (exceptuando por los ensayos con bacterias en distintas fases de crecimiento, donde los cultivos crecieron por 8, 16 y 24 h). Al finalizar el crecimiento se midió $DO_{600\text{ nm}}$ y se determinó la concentración de biomasa presente en los mismos. Los cultivos luego se centrifugaron a 5000 rpm, a 4°C durante 15 minutos. Una vez finalizadas las rondas de centrifugación y descarte del sobrenadante, se lavaron los pellets bacterianos con 5 mL de agua destilada, para eliminar el remanente de medio de cultivo. Tras una última centrifugación en las mismas condiciones, los pellets bacterianos fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

3.2.7.2. Estudio del efecto de la fase de crecimiento de las células en reposo en las biotransformaciones

El ensayo se llevó a cabo en placas de 24 pocillos de NEST (Ginebra, Suiza). Se inoculó cada pocillo con de una suspensión bacteriana para una concentración final de 1g/L de bacteria,

considerando las tres fases de crecimiento seleccionadas. Las reacciones se realizaron partiendo de 50 g/L de sustrato y 1 g/L de células. Se agregó agua destilada hasta alcanzar el volumen final de 1,4 mL/pocillo. Las placas se incubaron durante 24 h en un agitador orbital a 30 o 37°C a 200 rpm. Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado.

3.2.7.3. Estudio del efecto de la concentración de células en las biotransformaciones

El ensayo se llevó a cabo en placas de 24 pocillos de NEST (Ginebra, Suiza). Las reacciones se realizaron partiendo de 50 g/L de sustrato. Se probaron distintas concentraciones de bacterias, generando suspensiones bacterianas para obtener concentraciones finales de 1 g/L, 2 g/L y 10 g/L, a partir de los pellets generados. Se agregó agua destilada, hasta alcanzar el volumen final de 1,4 mL/pocillo. Las placas se incubaron durante 24 h en un agitador orbital a 30 o 37°C a 200 rpm. Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado.

3.2.7.4. Estudio del efecto de la concentración de sustrato en las biotransformaciones

El ensayo se llevó a cabo en placas de 24 pocillos de NEST (Ginebra, Suiza). Se probaron diferentes concentraciones iniciales de sustrato (15 g/L, 50 g/L, 70 g/L y 120 g/L). Se inoculó con una suspensión bacteriana para obtener una concentración final de bacteria de 2 g/L. Se agregó agua destilada, hasta alcanzar el volumen final de 1,4 mL/pocillo. Las placas se incubaron durante 24 h en un agitador orbital a 30 o 37°C, a 200 rpm. Se tomaron muestras periódicamente para analizar la cinética de generación de productos, así como también el consumo de sustrato. Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado.

3.2.8. Biotransformaciones a escala de matraces

Con las mejores condiciones obtenidas en los ensayos anteriores, se realizó el escalado a matraces de 250 mL. Los matraces en donde se llevaron a cabo las reacciones fueron autoclavados. Se prepararon 30 mL de medio de reacción, de acuerdo con lo obtenido en ensayos anteriores (glicerol 70 g/L y glucosa 50 g/L). Se inocularon los matraces con una suspensión bacteriana, para alcanzar una concentración final de 2 g/L de bacteria. Los matraces se incubaron durante 24 h en un agitador orbital a 30°C y a 200 rpm. Se tomaron muestras

periódicamente para analizar la cinética de generación de productos, así como también el consumo de sustrato.

3.2.9. Cuantificación por HPLC

Se prepararon las muestras realizando una centrifugación a 13500 rpm durante 2 minutos, separando el sobrenadante y descartando los pellets. El sobrenadante se diluyó y se filtró con filtro de 0,22 μm , colocando el filtrado en viales de HPLC.

Las muestras se analizaron utilizando el equipo *Shimadzu Nexera X2* (Kioto, Japón) equipado con detectores RID y PDA. La detección por HPLC se llevó a cabo empleando una modalidad isocrática, con un flujo de 0,6 mL/min, fase móvil H₂SO₄ 5 mM: Acetonitrilo (70:30) y una temperatura de 70°C. La columna utilizada fue una Rezex RHM- Monosaccharide H + de Phenomenex (California, EEUU).

El detector RID fue utilizado para la detección de los sustratos glucosa (Tret=11,3) y glicerol (Tret= 14,6). El detector PDA fue utilizado para la detección de los productos de oxidación AGlu (220 nm, Tret=10,1), C9,6 (220 nm, 9,6 min), DHA (271 nm, Tret =13,4 min) y GA (210 nm, Tret =11,7 min). El análisis de las muestras fue llevado a cabo con el software *LabSolutions®* de Shimadzu (Kyoto, Japon).

Se realizaron curvas de calibración para los compuestos glucosa y AGlu para un rango de 0,3 a 20 g/L.

Para la cuantificación de Glicerol, DHA y GA, se utilizaron curvas de calibración previamente obtenidas por el grupo de investigación (Ver anexos, Figura A1).

4. Resultados y discusión

De acuerdo con lo mencionado en la Introducción de esta tesis, la alta potencialidad de las bacterias del género *Gluconobacter* como biocatalizadores industriales queda demostrada en su capacidad destacada de oxidar una variedad de sustratos hacia productos de alto valor, que son posteriormente liberados al medio de reacción. La posibilidad de utilizarlas como células en reposo para la obtención de estos compuestos potencia su aplicabilidad, facilitando los procedimientos de purificación y potencialmente abaratando costos productivos. Además, su ampliamente documentada capacidad para la revalorización de residuos industriales los convierte en catalizadores ideales para procesos de biorrefinería, promoviendo así el desarrollo de prácticas sostenibles en consonancia con los principios de la química verde.

En particular, la cepa GCHM43 destaca por su notable termotolerancia. Aunque su potencial aún no ha sido completamente explorado, esta cepa puede crecer y realizar fermentaciones a temperaturas elevadas de hasta 37°C, lo que la hace ideal para aplicaciones industriales como las referidas en el párrafo anterior. Por otro lado, a pesar de las numerosas ventajas que presenta el uso de células en reposo, solo existe un reporte previo de biotransformación utilizando esta estrategia con células de GCHM43. Por este motivo continuar con el estudio de esta estrategia de implementación para esta cepa bacteriana resulta especialmente relevante para determinar su potencial y su aplicabilidad a nivel industrial.

Como se mencionó anteriormente, aunque GCHM43 fue utilizada exitosamente para la oxidación de una serie de sustratos, tanto la glucosa como el glicerol aún no han sido ensayados como tales en reacciones catalizadas por células en reposo de esta cepa. Ambos sustratos son de relevancia industrial, ya que son los principales componentes de los residuos generados en la industria del biodiesel y la agrícola-forestal. Por lo tanto, el estudio de su oxidación es altamente pertinente para el desarrollo de procesos de biorrefinería. El desarrollo de estos procesos contribuye a una economía circular, y ayuda a reducir el impacto ambiental de los residuos. Este enfoque no solo mejora la sostenibilidad de los procesos industriales, sino que también aprovecha eficientemente los recursos disponibles, transformando desechos en productos de valor agregado como el AGlu, la DHA y el GA.

Bajo esta premisa, en el contexto de esta tesis, se decidió adquirir la cepa GCHM43 para llevar a cabo un estudio preliminar sobre su capacidad de conversión de los sustratos antes mencionados, utilizando células en reposo. Este análisis inicial es el primer paso para evaluar su potencial aplicación a nivel industrial. Los resultados obtenidos, se presentan a continuación.

4.1. Estudios de caracterización e identificación de GCHM43

Dado que la cepa GCHM43 fue ingresada al cepario del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT en el marco de este trabajo, se realizó su reconstitución inicial a partir de una ampolla con bacterias liofilizadas. Posteriormente, se verificó su identidad para asegurar que el proceso de reconstitución se hubiera llevado a cabo correctamente. Como base para la confirmación de su identidad se utilizó el trabajo anteriormente aludido de Moonmangmee et al, donde la cepa se identificó y caracterizó por primera vez (17). A continuación, se presenta un compendio de las características descritas por los autores (Tabla 6).

Tabla 6. Características de la cepa *Gluconobacter sp.* CHM43, según lo reportado en el estudio de Moongmangmee et al (17).

Características	GCHM43
Forma	Bacilo
Gram	-
Flagelación	Polar
Pigmentación en medio GYP	-
Crecimiento a pH 3.0	+
Producción de ácido acético a partir de etanol	+
Oxidación de lactato a carbonato	-
Formación de DHA a partir de glicerol	+
Requerimiento de vitaminas	+
Crecimiento a:	
10°C	+
20°C	+
25°C	+
30°C	+
33°C	+
37°C	+
Temperatura óptima para el crecimiento	30-33°C
Producción de catalasa	+

En base a estos datos, se realizaron distintos ensayos para su identificación, como cultivo en placa y posterior observación de la morfología de las colonias, tinción de Gram, crecimiento a distintas temperaturas y desarrollo de una PCR para detección del gen del ARNr 16s. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

4.1.1. Estudio de la morfología de GCHM43

Un primer ensayo buscó determinar las características morfológicas de la cepa a partir de su cultivo en placa. Se generó una estría de GCHM43 medio GG agar a partir de una suspensión generada a partir del polvo liofilizado, con el fin de obtener colonias aisladas para poder analizar su morfología. El medio seleccionado para el crecimiento de la cepa fue el medio GG agar, un medio basado en el reportado por Habe et al, para el crecimiento de este microorganismo (16). Este medio fue seleccionado por sus componentes, ya que contiene como fuentes de carbono glicerol y glucosa, los sustratos cuya biotransformación es el foco de esta Tesis. La presencia

de los sustratos de interés como fuente de carbono durante el crecimiento de *Gluconobacter* ha demostrado ser de especial relevancia para obtener altos rendimientos de transformación en reacciones posteriores, empleando las células como catalizadores en reposo (48). La temperatura utilizada para el cultivo en esta oportunidad fue 30°C, la temperatura óptima reportada para el crecimiento de esta y la mayoría de las cepas de *Gluconobacter*.

Si bien en el estudio de Moonmangmee et al no llevaron a cabo una descripción detallada de las colonias obtenidas, su coloración si fue documentada por Hattori et al en un reporte posterior (19). Las mismas presentaron una coloración beige con un ligero tinte rosa que es similar a la reportada para bacterias de la especie *G. frateurii* (19). Tomando en consideración que inicialmente esta cepa fue clasificada como parte de esta especie, resulta lógico que sus colonias presenten a nivel macroscópico características similares a las descritas para *G. frateurii*. En general, en medios de cultivo sólido, las colonias de *G. frateurii* son pequeñas, circulares, de color amarillo blancuzco con un ligero tinte rosa, algo translúcidas y presentan cierta elevación (49).

Las colonias obtenidas en este ensayo presentaron un tamaño pequeño, con forma redondeada y con bordes lisos o levemente irregulares, así como también una ligera elevación (Figura 6A). El color presentado por las colonias fue beige tendiendo a rosa claro. La coloración de las colonias obtenidas y su forma es consistente con el reporte de Hattori et al, en el que se observan imágenes del crecimiento en placa de GCHM43. Adicionalmente, se puede decir que la descripción también coincide con la otorgada por Ripoll & Bravo para las colonias de una cepa de *G. frateurii* (49).

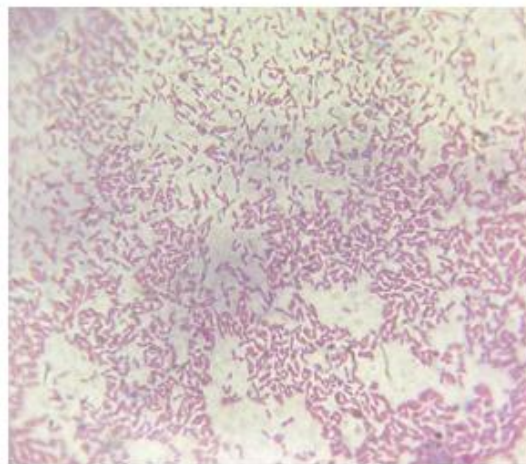
A.**B.**

Figura 6. Morfología macro- y microscópica de GCHM43. **(A)** Placa de medio GG agar, con colonias aisladas de GCHM43 obtenidas luego de su incubación a 30°C por 24 h. **(B)** Visualización al microscopio óptico de una colonia aislada teñida con la técnica de Gram.

Con una de las colonias aisladas, se continuó realizando una tinción de Gram, siguiendo la técnica de Hucker. Este proceso se realizó con el objetivo de determinar la morfología a nivel microscópico de las bacterias (Figura 6B). La técnica de tinción de Gram es un método diferencial que clasifica las bacterias en Gram positivas y Gram negativas, basándose en la estructura de sus paredes celulares. Las bacterias Gram positivas retienen el cristal violeta y se observan de color púrpura debido a su gruesa pared de peptidoglicano, mientras que las Gram negativas, con una pared más fina, no retienen este colorante y adquieren un color rosado al ser teñidas por la safranina.

Las bacterias presentaron forma de bacilos Gram negativos, descripción que coincide con la aportada por Moonmangmee et al para esta cepa, y que coincide además con la reportada en la literatura para las bacterias del género *Gluconobacter*. Por ejemplo, en el estudio realizado por Dwidevi et al donde se describen las características más importantes para el reconocimiento de este género de bacterias (50).

4.1.2. Prueba de la catalasa

Esta prueba se realizó para establecer la presencia de la enzima catalasa en GCHM43, una enzima típica en las bacterias aerobias. La prueba de la catalasa se basa en la capacidad que tienen las bacterias de escapar del daño producido por peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un compuesto muy tóxico del metabolismo de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas (51). Ante esto, las bacterias antes mencionadas tienden a producir la enzima catalasa, que favorece la desintoxicación celular a través de la neutralización del efecto bactericida de este compuesto. Una vez que las bacterias producen la catalasa, esta cataliza la descomposición del H_2O_2 , en H_2O y oxígeno (51, 52).

En este ensayo, un resultado positivo se da cuando se observan burbujas de oxígeno donde se colocó la bacteria, indicando la presencia de la enzima catalasa. Según el trabajo de referencia de Moonmangmee et al, está reportado que la especie GCHM43 es catalasa positiva. Este resultado es concordante con el hecho de que las especies de *Gluconobacter* son aerobias estrictas (17). Una imagen de los resultados obtenidos durante este ensayo se presenta a continuación (Figura 7).

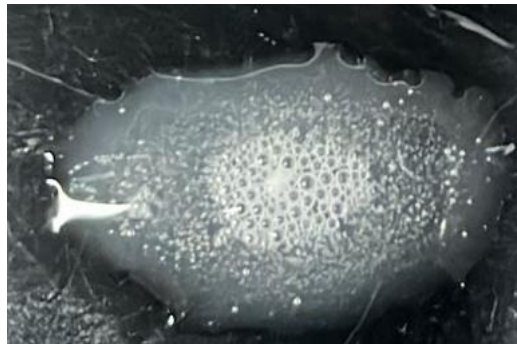


Figura 7. Prueba de la catalasa para una colonia aislada de GCHM43.

Se observó la formación de burbujas en la superficie de la placa de vidrio, evidenciando de esta forma la presencia de enzimas catalasa, que participan en la descomposición del peróxido.

4.1.3. Estudio del crecimiento a distintas temperaturas

Según lo reportado en el estudio de Moonmangmee et al (Tabla 6) la cepa GCHM43 probó su termotolerancia mostrando crecimiento en el rango entre 10 y 37 °C (17). En base a esto y para continuar con la identificación de la cepa, se realizaron ensayos preliminares de crecimiento tanto en medio líquido (a 30 y 37°C), como en medio sólido (a 37° C) durante 24 h. La selección

de las temperaturas utilizadas para los ensayos se llevó a cabo considerando nuevamente que la temperatura 30°C es la óptima reportada para las bacterias del género *Gluconobacter*, mientras que 37°C es la máxima temperatura ensayada por Moonmangmee et al en la que GCHM43 presentó crecimiento (17). Nuevamente, los inóculos de la placa y los cultivos líquidos fueron parte de la suspensión de bacterias obtenida a partir del polvo liofilizado de la ampolla de GCHM43.

Para este análisis preliminar de crecimiento en medio líquido no se midió DO_{600nm} , sino que el crecimiento fue únicamente evaluado de manera visual, observando la diferencia de turbidez con respecto al medio sin inocular. Nuevamente, de acuerdo a lo esperado por lo descrito por Monmangmee et al (17), se observó crecimiento de GCHM43 en las dos condiciones de temperatura ensayadas (Figura 8).

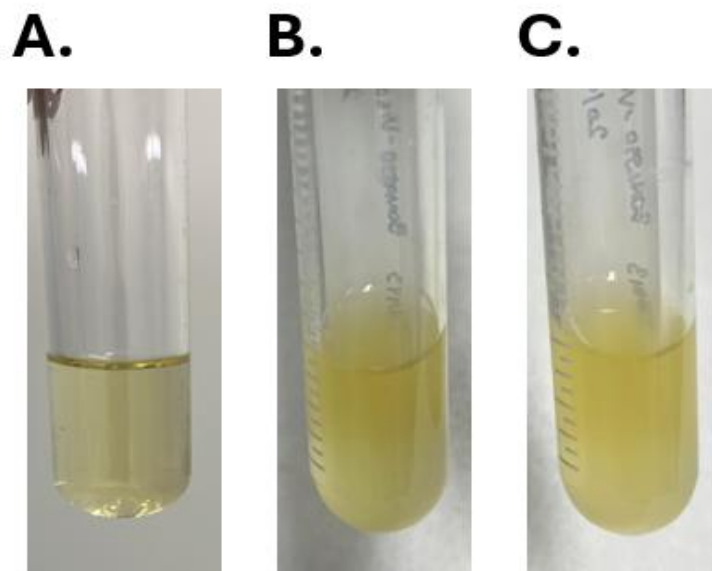


Figura 8. Ensayo de crecimiento en tubos. (A) Tubo con medio GG sin inocular. (B) Tubo con medio GG inoculado e incubado durante 24 h a 30°C. (C) Tubo con medio GG inoculado e incubado durante 24 h a 37°C.

Por otro lado, los ensayos de crecimiento en medio sólido a 37°C también presentaron crecimiento luego de 24 h (Figura 9). El crecimiento a 30 °C ya había sido confirmado en el experimento anterior, en el que se estudió la morfología de las bacterias. De acuerdo con el resultado positivo obtenido en el cultivo líquido de GCHM43 a 37°C, el crecimiento de las bacterias a esta temperatura en el medio sólido era esperable.

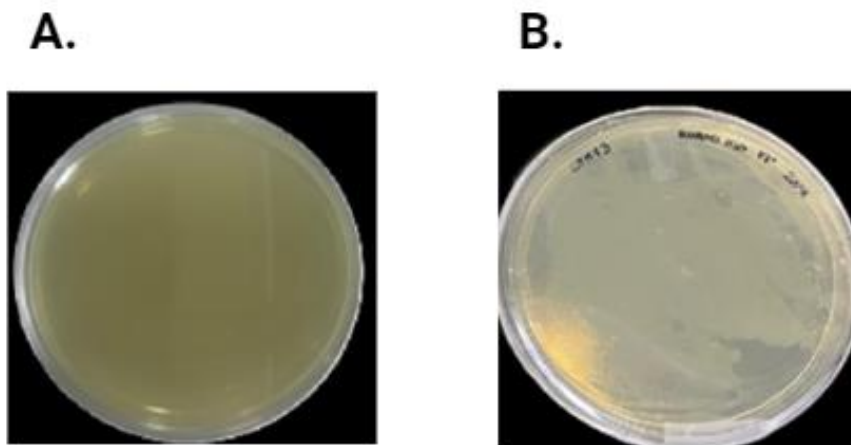


Figura 9. Ensayo de crecimiento en placa con medio GG agar. **(A)** Placa con medio GG agar sin inocular. **(B)** Placa con medio GG agar inoculada y crecida a 37°C durante 24 h.

4.1.4. Identificación de GCHM43 por PCR

Para complementar las técnicas anteriormente mencionadas para la identificación de GCHM43, se decidió diseñar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tomando como secuencia blanco un fragmento del gen del ARNr 16S de la cepa. La PCR se destaca del resto de las técnicas de identificación debido a su alta sensibilidad, rapidez y especificidad para la detección e identificación de bacterias. Esta técnica permite obtener resultados de alta confiabilidad mediante el uso de cebadores específicos en un tiempo reducido, en comparación con otras técnicas. Esto la convierte en una herramienta crucial para implementar en procesos industriales, por ejemplo para la evaluación de la contaminación en cultivos o reacciones (53).

El diseño de la reacción de PCR planteada en el contexto de esta Tesis responde a un doble propósito. Primero, la PCR dirigida al gen del ARNr 16S permite identificar y confirmar la identidad de la cepa, al menos a nivel de género. Esta elección se basa en las características únicas del gen del ARNr 16S, que lo hacen ideal para la identificación bacteriana. Esta región es ampliamente utilizada con fines de identificación porque contiene segmentos altamente conservados, intercalados con regiones variables que proporcionan información específica para cada género bacteriano (54). Dependiendo de los cebadores utilizados, esta técnica no solo puede identificar bacterias a nivel de género, sino que en algunos casos también puede permitir la detección a nivel de especie.

En segundo lugar, la técnica de PCR puede convertirse en una herramienta valiosa para detectar posibles contaminaciones con microorganismos distintos a *Gluconobacter*, como la frecuente contaminación por *E. coli*. Además, dependiendo del diseño de los cebadores, esta PCR podría permitir la detección de otras especies dentro del género *Gluconobacter*. Dado que el grupo de investigación trabaja con varias cepas de *Gluconobacter* distintas a GCHM43, esto sería útil para evaluar la pureza de los inóculos bacterianos y las reacciones de cara a posibles contaminaciones.

En base a esto, se procedió con el diseño de cebadores y del protocolo de amplificación.

4.1.4.1. Diseño de cebadores

Para el diseño de los cebadores a utilizar en la reacción, se comenzó con la búsqueda de la secuencia del gen del ARNr 16S de GCHM43 en el repositorio NCBI (número de acceso AB678443), de acuerdo a lo descrito por Hattori et al (19). A su vez, se buscó la secuencia del genoma completo de GCHM43 en el repositorio GenBank (número de acceso BADZ00000000). La búsqueda del genoma completo de GCHM43 fue crucial debido al tipo de molde seleccionado para la reacción de PCR, que consistió en una extracción de ADN genómico de GCHM43. Al utilizar el genoma completo, es fundamental asegurarse de que los cebadores hibriden específicamente en la región deseada, evitando así la potencial generación de amplicones inespecíficos que podrían llevar a resultados indeseados.

Utilizando la herramienta Primer3, se buscó generar un juego de cebadores específicos que amplificaran una región del gen del ARNr 16S de GCHM43, seteando un tamaño de amplicón esperado entre 300 - 500 pb. Se obtuvieron una serie de pares de cebadores, de entre los cuales se seleccionó el detallado en la Tabla 7. De acuerdo a los resultados obtenidos en *Primer3*, este par de cebadores otorgaría como resultado un amplicón de 300 pb.

Tabla 7. Par de cebadores diseñado para amplificar el gen del ARNr 16S de GCHM43, generando un amplicón de 300 pb.

Nombre	Dirección	Secuencia (5' - 3')	T de <i>melting</i> (°C)
16S CHM43 F BV	Sentido	GGCAGCAGTGGGGAATATTG	58 °C
16S CHM43 R BV	Antisentido	CCACAACCCTCTCTCGAACT	

La selección de este par de cebadores se llevó a cabo en base una evaluación *in silico* de los mismos, utilizando una serie de herramientas computacionales. Primeramente, se evaluó utilizando *PrimerBlast* del NCBI, que el juego de cebadores no genere otros productos de PCR a partir del genoma de la bacteria, utilizando como fuente de datos la secuencia obtenida de *Genbank*. Este análisis, arrojó como único resultado la secuencia correspondiente al producto esperado, indicando que no se generarían otros amplicones en estas condiciones.

Luego se chequeó la probabilidad de la formación de dímeros de cebadores (homodímeros y heterodímeros) con *OligoAnalyzer* de IDT. Esto se debe a que la formación de este tipo de estructuras puede interferir con la amplificación del ADN (ya que genera competencia) y reducir la eficiencia de la reacción de amplificación. Los resultados obtenidos utilizando esta herramienta demostraron que el par de cebadores no presentaba altas probabilidades de formación de dímeros, para ninguna de las tres posibilidades. En general, se busca que el cambio de energía libre de la posible formación del dímero sea mayor a -9 kcal/mol. Usualmente, valores menores a este indican que la probabilidad de formación de dímeros es alta. La posibilidad de formación heterodímeros presentó como máximo un cambio de energía libre de -6,4 kcal/mol, mientras que se obtuvieron máximos cambios de energía libre posibles de -7,8 kcal/mol y -6,8 de kcal/mol para la formación de homodímeros correspondientes al cebador sentido y al cebador antisentido, respectivamente.

La realización de estos primeros análisis *in silico* radica en la importancia de obtención de un par de cebadores que sean específicos y eficientes a la hora de utilizarlos en una PCR. Los resultados obtenidos hasta este momento indicaban que los cebadores seleccionados eran específicos para una región en particular del gen del ARNr 16S de GCHM43, por lo que una reacción llevada a cabo utilizando el genoma completo de la bacteria como molde en principio

solo arrojaría como resultado la banda esperada de 300 pb. Por otro lado, la formación de dímeros de cebadores no presentaba una alta probabilidad. En base a esto se puede determinar que en estas condiciones sería posible identificar la cepa por PCR, al menos a nivel de género.

Para anticipar los posibles resultados de una reacción de PCR utilizando los cebadores seleccionados y el ADN genómico de bacterias que podrían contaminar los cultivos o las reacciones de conversión, se utilizó nuevamente la herramienta *PrimerBlast*. Los genomas bacterianos seleccionados como bases de datos para este ensayo fueron el de *E. coli*, el de *G. frateurii* NBRC103465, y el de *G. oxydans* NBRC 14819. Como se mencionó con anterioridad, dadas las actividades que se realizan en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad, la contaminación con *E. coli* resulta recurrente. A su vez, las cepas de *Gluconobacter* mencionadas son frecuentemente utilizadas por el grupo de investigación, por lo que una contaminación con estas bacterias también resultaría posible. Idealmente, se buscaría que los cebadores seleccionados presentaran un patrón de bandas diferencial al obtenido para GCHM43, lo que permitiría visualizar fácilmente una potencial contaminación de un cultivo o una reacción en estudio.

El análisis de *PrimerBlast* utilizando como molde el genoma de la especie *E. coli* no mostró amplicones posibles, lo que indica que los cebadores no amplifican ADN de *E. coli*. En este caso, este par de cebadores no permitiría determinar una posible contaminación con esta bacteria. Por su parte, para el caso del genoma de *G. oxydans* NBRC 14819, la búsqueda tampoco arrojó amplicones posibles, impidiendo entonces la detección de una posible contaminación con esta cepa utilizando esta técnica. Sin embargo, para el caso de *G. frateurii* NBRC 103465, se observó un posible amplicón de 300 pb. Dado que la cepa GCHM43 estaba anteriormente catalogada como *G. frateurii* este resultado era esperable, ya que es posible que las secuencias de los ARNr 16S de estas dos bacterias presenten una homología de secuencia muy alta. En este entendido, los cebadores seleccionados tampoco podrían detectar una contaminación con esta cepa de *G. frateurii*.

En base a estos hallazgos, un resultado positivo de la reacción de PCR utilizando estos cebadores permitiría determinar que la cepa reconstituída es GCHM43 con un nivel de confianza elevado, al menos al nivel de género. No obstante, esta herramienta no permitiría la detección de potenciales contaminaciones en cultivos y reacciones, al menos con las bacterias identificadas como posibles contaminantes. A efectos de esta Tesis, se decidió continuar con

los cebadores seleccionados para utilizar en una reacción de PCR complementaria a la identificación de la cepa obtenida a partir de la reconstitución del polvo liofilizado de GCHM43 obtenido en la ampolla. Sin embargo, en el futuro resultaría interesante diseñar nuevos pares de cebadores para combinar con los obtenidos en este estudio e implementar una PCR de tipo multiplex, que generara patrones de bandas diferenciales en casos de contaminación bacteriana con estas bacterias de frecuente utilización en el laboratorio.

4.1.4.2. Amplificación por PCR de un fragmento del gen del ARNr 16S de GCHM43

Utilizando los cebadores previamente diseñados, se procedió a llevar a cabo la reacción de PCR utilizando como ADN molde una solución obtenida a partir de una extracción de ADN genómico de un cultivo líquido de GCHM43. Tanto la composición de la mezcla de reacción como el ciclado utilizado para este ensayo (Tablas 4 y 5, apartado 3.2.5.) fueron diseñados en base a las recomendaciones de *NZYtech*, el fabricante de la enzima Taq polimerasa utilizada.

La reacción de amplificación fue llevada a cabo por cuatuplicado, añadiendo además un control negativo en el que no se agregó molde de ADN. Los productos de la PCR fueron analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. Se observó que las bandas obtenidas en este gel se ubicaron alrededor de las 300 pb, lo cual corresponde con el tamaño esperado del amplicón (Figura 10).

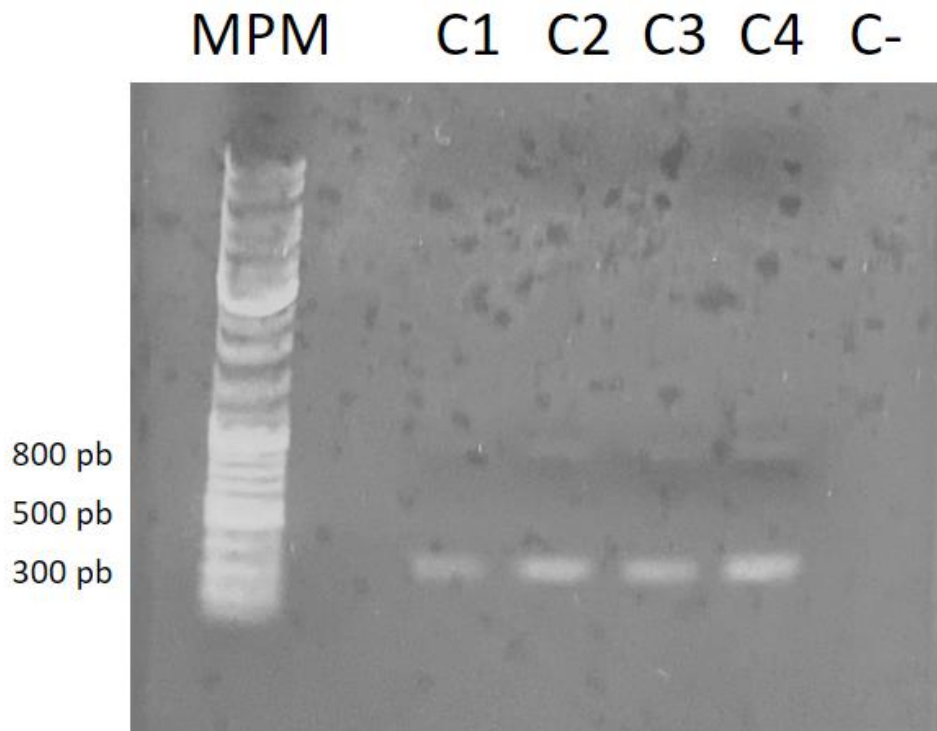


Figura 10. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del producto de PCR de la amplificación de una región del gen del ARNr 16S de GCHM43. (MPM) Marcador de Peso Molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo #SM0331), (C1, C2, C3 y C4) muestras analizadas correspondientes a réplicas experimentales, (C-) Control Negativo (sin molde).

Cabe destacar que se observó la aparición de unas bandas tenues a la altura de 800 pb, probablemente asociadas a una amplificación inespecífica. Esto pudo deberse a las condiciones de ciclado propuestas, pudiendo mejorar la especificidad de la PCR aumentando ligeramente la temperatura de *annealing*.

Considerando los resultados de este análisis, junto con los obtenidos en los demás ensayos de identificación descritos en las secciones anteriores, se puede afirmar con un alto nivel de confianza que la reconstitución de la cepa GCHM43 se llevó a cabo con éxito. Esta confirmación permitió dar paso a los ensayos de crecimiento de la cepa en matraces que se detallan a continuación.

4.2 Estudios de crecimiento a escala de matraces

Estudiar el crecimiento bacteriano es de suma importancia al comenzar a trabajar con una cepa recientemente adquirida. El estudio de las curvas de crecimiento bacteriano es valioso debido a

que permite entender la cinética de crecimiento, así como también la fisiología de las bacterias. Permite determinar las distintas fases de crecimiento, algo que más adelante será importante para la implementación de las bacterias como catalizadores de las reacciones de conversión en formato de células en reposo.

El crecimiento bacteriano en un medio líquido suele dividirse principalmente en cuatro fases bien definidas (Figura 11). Comienza con una fase de adaptación al medio de cultivo (también llamada fase lag), donde las células centran su energía en aclimatar su metabolismo a las condiciones ambientales y de nutrientes disponibles, con el fin de comenzar a crecer de manera exponencial (55). En esta fase, casi que ni ocurren procesos de división celular (56).

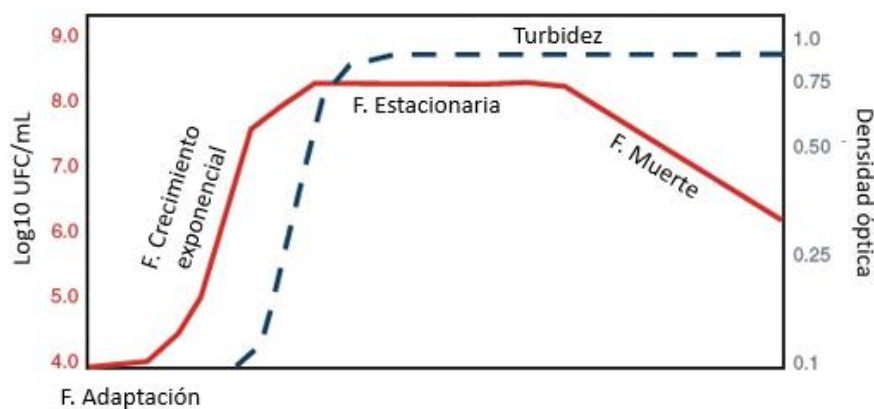


Figura 11. Curvas de crecimiento bacteriano típicas, obtenidas a partir de la determinación de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) (rojo) o a través de la medida densidad óptica (azul). Adaptado de Maier & Pepper (56). La expresión (F.) refiere a la abreviatura de la palabra fase.

Luego, en la fase de crecimiento exponencial, las células comienzan a dividirse a una velocidad constante, determinada por la naturaleza intrínseca de la bacteria y por las condiciones del medio (temperatura, pH, componentes del medio, etc) (56). Este crecimiento a alta velocidad, genera que se dé la velocidad máxima de consumo de nutrientes, por lo que estos se irán acabando con el paso del tiempo (57).

Posteriormente, las células entran en la fase estacionaria, una etapa de meseta donde la tasa de generación y la tasa de muerte celular se igualan, manteniendo constante el número total de células. En esta fase, la tasa de división disminuye en comparación con la fase previa debido al agotamiento de uno o más nutrientes esenciales para el crecimiento. Además, la acumulación

de metabolitos secundarios considerados tóxicos juega un papel fundamental tanto en la progresión de esta fase como en el inicio de la siguiente (55).

Por último, la fase de muerte, se da cuando la tasa de muerte celular, supera a la tasa de generación, disminuyendo el número de células viables en el medio de cultivo, generando de esta forma una declinación en la curva en el caso que se considere una medida de las células viables (55). Igualmente, cabe destacar que esta fase no es detectable cuando la curva se realiza por medidas de DO_{600nm} (debido a que aun muertas, la turbidez del medio no se ve afectada), como se muestra en la Figura 11.

La unión de las fases antes comentadas genera una curva sigmoideal, típica para la representación del crecimiento de una población bacteriana. A continuación, se presentan los estudios de crecimiento llevados a cabo para CHM43 a escala de matraces.

4.2.1. Estudios de crecimiento a distintas temperaturas

Este ensayo se realizó con el objetivo de determinar el comportamiento de crecimiento de GCHM43 en medio GG, al someter a los cultivos a diferentes temperaturas de incubación (30 y 37°C) (Figura 12). Una vez más, la temperatura de 30°C se seleccionó para este ensayo porque es la temperatura óptima reportada para el crecimiento de GCHM43 como se ha documentado en el estudio de Moonmangmee et al (17). La temperatura de 37°C se seleccionó para evaluar el desempeño de la cepa a temperaturas elevadas, teniendo en cuenta la ventaja que tiene la termotolerancia a nivel industrial, como se enfatizó previamente en la introducción. Los ensayos se siguieron por 25 h para el cultivo a 30°C y 35 h para el cultivo a 37°C, finalizando la toma de muestras luego de alcanzar la fase estacionaria de crecimiento.

Los datos obtenidos fueron ajustados utilizando el modelo de Gompertz, el cual se considera como la ecuación primaria más ampliamente utilizada para describir el crecimiento microbiano, la cual está basada en la relación entre la velocidad de crecimiento específica con la densidad de la población (7) (Figura 12).

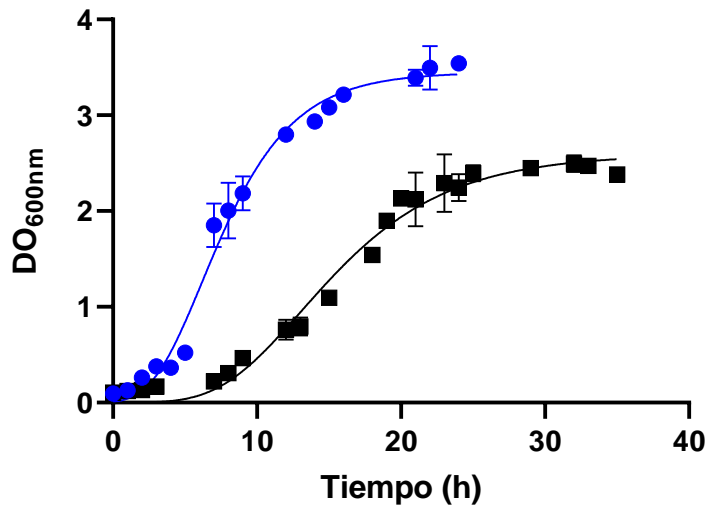


Figura 12. Curva de crecimiento de GCHM43 a 30°C (círculos azules) y 37°C (cuadrados negros), en medio GG. La curva azul posee un R2 = 0,984 y la curva negra posee un R2 = 0,979

De acuerdo con los resultados obtenidos, se comprobó que la bacteria sigue el comportamiento esperado para ambas temperaturas, presentando una fase de latencia, una fase de crecimiento exponencial y una fase estacionaria. Este resultado era el esperado para una curva de crecimiento construida a partir de medidas de la turbidez del medio.

Un análisis en profundidad de las curvas obtenidas mostró que a 30°C se presenta una fase lag corta, de alrededor de 2 h. Esto era previsible, ya que no se esperaba que las bacterias necesitaran de mucho tiempo de adaptación, debido a que los precultivos fueron realizados en el mismo medio, a 30°C. Sin embargo, a 37°C se ve que la fase lag es más duradera (alrededor de 6 h), a pesar de que los precultivos utilizados, habían sido crecidos a 37°C. Esto puede deberse a que a esta temperatura CHM43 presenta un crecimiento más lento. En concordancia, la fase de crecimiento exponencial es más corta a 30°C, debido a que, al duplicarse la población bacteriana en un menor tiempo, se da un consumo mayor de los sustratos disponibles en el medio, alcanzando antes el máximo crecimiento. A 37°C, al tener una velocidad de crecimiento menor, la fase de crecimiento exponencial se mantiene por más tiempo, hasta finalmente alcanzar la fase estacionaria.

El crecimiento a 30 °C es mayor y más rápido ($3,54 \pm 0,05$ DO_{600nm}), en comparación al crecimiento a 37°C ($2,47 \pm 0,01$ DO_{600nm}). En el estudio realizado por Moonmangmee et al (17), aunque utilizan otro medio de cultivo obtienen un resultado concordante, ya que mencionan

que el mayor crecimiento de esta cepa se obtiene a 30°C, pero que luego disminuye con el aumento de temperatura. Con respecto a los valores de DO_{600nm} alcanzados, se puede decir que se encuentran cercanos a los valores máximos obtenidos anteriormente para cepas de *Gluconobacter* crecidas en estas condiciones. Habe et al estudiaron el crecimiento de GCHM43 a 30°C, obteniendo un valor de DO_{600nm} cercano a 4 (16). Adicionalmente, Ripoll & Bravo alcanzaron una DO_{600nm} de 3, en el crecimiento de *G. frateurii* en un medio con glucosa creciendo esta cepa en matraz (49). Cabe recordar que la cepa GCHM43 estaba anteriormente catalogada como parte de la especie *G. frateurii*, por lo que el resultado alcanzado concuerda con ello. Además, este tipo de crecimiento a valores de DO_{600nm} relativamente bajos, es característico del género *Gluconobacter*, debido a que utilizan las fuentes de carbono para generar energía por fermentación oxidativa, por encima de favorecer su metabolismo central y la subsecuente producción de biomasa (58).

A partir de estos resultados, se decidió que los precultivos necesarios para la realización de los próximos experimentos sean crecidos a 30°C, permitiendo así que su crecimiento de forma más rápida. Además, se logró determinar que el crecimiento a 30°C resulta en mayor rendimiento de biomasa para el crecimiento de inóculos para las reacciones con células en reposo. Asimismo, se pudo llevar a cabo la identificación de las distintas fases de crecimiento en estas condiciones, lo que será clave para el estudio de las biotransformaciones con estas células. Esta identificación precisa de las fases de crecimiento facilitará la determinación del mejor momento para la recolectar las células a utilizar en reposo, mejorando así los rendimientos de los procesos de biotransformación.

4.2.2. Obtención de curva de peso seco

La implementación de una metodología que permita la cuantificación de la cantidad de biomasa presente en un cultivo es de suma importancia para poder realizar conversiones con células en reposo. Esta cuantificación permite la preparación precisa de los inóculos bacterianos a utilizar en las reacciones, dependiendo de la concentración de biomasa a utilizar. Existen diversos métodos para llevar a cabo esta determinación, siendo uno de los más utilizados, el método de estimación del peso seco. Este es un método sencillo y directo de cuantificación, que permite medir la biomasa en una suspensión generando una relación entre la concentración de biomasa y la absorbancia de un cultivo (56).

Para la realización del método, se dejó crecer un cultivo hasta la DO_{600nm} máxima. Para el caso del cultivo utilizado, se alcanzó una $DO_{600nm} = 3,24 \pm 0,08$. A partir de este cultivo, se generaron diluciones para obtener suspensiones bacterianas con valores de DO_{600nm} de entre 0,4 y 3,2. Una vez corroborada la DO_{600nm} obtenida por espectrofotometría, las suspensiones fueron centrifugadas, obteniendo pellets bacterianos que fueron lavados con agua destilada y posteriormente secados en estufa hasta peso constante. Una vez secos se pesaron y se construyó la gráfica de DO_{600nm} vs Biomasa (g/L) (Figura 13).

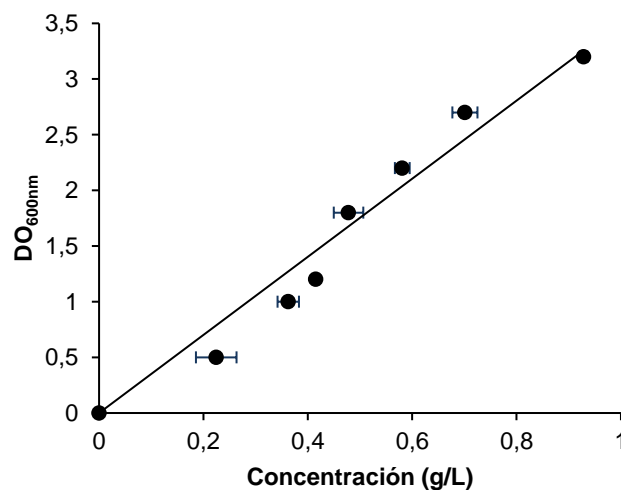


Figura 13. Curva de peso seco para GCHM43 ($y = 3,5057x$, $R^2 = 0,99$).

Con los valores obtenidos se realizó un ajuste lineal y se obtuvo una ecuación de la recta $y = 3,5057x$, con un valor de R^2 de 0,99. A modo comparativo, según lo observado en bibliografía, en el estudio de Iturralde et al generan una curva con un valor de pendiente cercano al obtenido en este estudio ($y = 4,3x$), pese a utilizar otra cepa de *Gluconobacter* (38, 59). Dadas las similitudes entre las distintas bacterias de este género, es esperable obtener resultados comparables. Se debe tener en cuenta que el método de determinación de biomasa utilizado, aunque de uso habitual, presenta cierta variabilidad asociada a su implementación, lo que puede explicar las diferencias observadas (60).

La curva posibilita la estimación de la cantidad de biomasa generada a través de la medición de DO_{600nm} , lo cual como se mencionó anteriormente, es fundamental para la obtención de los inóculos necesarios para las reacciones con células en reposo. Esta correlación directa entre la absorbancia medida y el peso seco de las células proporciona una herramienta sencilla y precisa

para cuantificar la biomasa en los cultivos, asegurando así la consistencia y reproducibilidad en los ensayos de conversión.

4.3. Biotransformaciones utilizando células en reposo de CHM43

Como ya fue establecido durante la introducción de este trabajo, la posibilidad de aprovechar los compuestos presentes en los residuos mediante biotransformación o conversión a productos de valor agregado es una realidad hacia la cual el mundo tecnológico avanza cada vez más. Actualmente, las biotransformaciones ofrecen una amplia variedad de oportunidades gracias a la adaptabilidad y diversidad metabólica de los microorganismos. Además, el establecimiento de biorrefinerías, entendidas como el uso sustentable de los recursos naturales para su conversión en productos biotecnológicos con valor comercial, ofrece una alternativa viable para enfrentar problemas de contaminación a nivel mundial. Ejemplos de estos problemas son el generado por el glicerol en la industria del biodiesel, o los residuos altos en glucosa, provenientes principalmente de la industria agrícola-forestal.

En particular, el uso de células en reposo de la cepa GCHM43 se presenta como una buena alternativa para llevar a cabo estas reacciones de valorización, no solo por su capacidad oxidativa, sino por la potencial adaptabilidad a las condiciones industriales que le otorga su condición de termotolerante. En este apartado de la Tesis, se presentarán los resultados obtenidos con respecto al estudio de la capacidad de las células en reposo de GCHM43 de llevar a cabo conversiones de glucosa y glicerol, para la obtención de los productos de valor agregado AGlu, DHA y GA.

Para ello, se evaluó el efecto de distintos parámetros (fase de crecimiento en el que se colectan las bacterias utilizadas, concentración de bacterias, concentración inicial de sustrato, temperatura) para favorecer las conversiones antes mencionadas. Estos experimentos se llevaron a cabo a pequeña escala, utilizando placas de 24 pocillos, lo que permite realizar múltiples reacciones simultáneamente. Esta metodología es particularmente útil en las primeras etapas de una investigación, ya que facilita el estudio de las distintas condiciones experimentales y la rápida evaluación de diferentes variables, minimizando el uso de recursos y tiempo. Además, dado que se trataba de una aproximación inicial a las conversiones de estos sustratos por las células en reposo de GCHM43, se optó por trabajar con los mismos en estado

puro. Esto facilita el estudio de la capacidad de conversión de las células en condiciones ideales, sin la interferencia de posibles contaminantes presentes en los residuos crudos.

Posteriormente, con las mejores condiciones obtenidas, se realizó un escalado de las reacciones de conversión de glicerol y glucosa utilizando matraces agitados, como primer paso para comprobar la escalabilidad del proceso.

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante esta etapa de la investigación.

4.3.1. Biotransformaciones de glucosa

Una característica relevante de las bacterias del género *Gluconobacter*, es su capacidad de convertir glucosa en AGlu, lo que constituye un producto de mayor valor de mercado, con diversas aplicaciones industriales que ya fueron discutidas. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes del uso de GCHM43 para llevar adelante esta reacción, que resulta ampliamente interesante en el contexto de la valorización de residuos de la industria agrícola forestal. En base a esto surge la motivación de estudiar la capacidad de la cepa de interés para la obtención de este compuesto.

El estudio de la oxidación de glucosa a AGlu requirió de la implementación de una metodología de detección y cuantificación del sustrato y producto de la reacción. Mientras que en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ya se contaba con métodos de detección de otros compuestos involucrados en reacciones de oxidación catalizadas por *Gluconobacter* por HPLC (incluido el glicerol y sus productos de oxidación), los mismos nunca habían sido evaluados para la detección y cuantificación de glucosa o AGlu. Por ello, antes de comenzar con el análisis de las conversiones, fue necesario establecer las condiciones de análisis para la detección de los compuestos de interés utilizando HPLC.

4.3.1.1. Desarrollo de un método de detección para glucosa y AGlu por HPLC

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución, también conocida como HPLC, es una herramienta extremadamente poderosa para la identificación y cuantificación de compuestos en muestras complejas. Este tipo de cromatografía se basa en la inyección de una muestra en una

columna porosa, la cual contiene la fase estacionaria que determina el método de separación. La muestra es impulsada a través de la columna por una fase líquida, conocida como fase móvil, que se bombea a alta presión (58). La separación en HPLC se fundamenta en la adsorción del soluto en la fase estacionaria, lo que depende de la afinidad del soluto con dicha fase.

En el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT, se cuenta con un equipo *Shimadzu UVmini 1240*, con 2 detectores diferentes: RID (*Refractive Index Detector*) y PDA (*Photodiode Array Detector*). El detector RID, se basa en la medición de los cambios en los índices de refracción que ocurre cuando un compuesto eluye en la columna (61). Por su parte, el detector PDA, mide la absorbancia de la luz en múltiples longitudes de onda de manera simultánea, lo que permite obtener un espectro completo de los compuestos eluyentes (62). Las señales captadas por estos detectores se presentan como un cromatograma en el que los distintos picos obtenidos corresponden con los componentes presentes en la muestra.

A la hora de analizar muestras de una biotransformación por HPLC, se debe tener establecida una metodología que permita una correcta separación de los compuestos de interés. Para esta biotransformación, al utilizar GCHM43, se esperaba obtener en principio 2 picos correspondientes a los compuestos (glucosa y AGlu).

Como se mencionó previamente, el grupo de investigación ya contaba con un método para la detección de otros compuestos vinculados a reacciones de oxidación catalizadas por *Gluconobacter*, pero hasta el momento, la detección de glucosa y AGlu no había sido llevada a cabo. Con la finalidad de determinar si la metodología ya utilizada por el grupo permitía la correcta separación de glucosa y AGlu se llevaron a ensayos preliminares en los que se analizaron estándares de estos compuestos, utilizando los dos detectores disponibles.

Se utilizó la columna *HPLC Rezex RHM- Monosaccharide H +* (cuya separación se basa en el principio de exclusión aniónica), utilizando como fase móvil H₂SO₄ 5 mM:ACN (70:30) a un flujo de 0,6 mL/min. La separación fue isocrática y se llevó a cabo a 70°C. Las muestras a analizar fueron soluciones de glucosa 20g/L y AGlu 20 g/L. Considerando las estructuras de las moléculas, en este primer ensayo la longitud de onda de detección del PDA fue fijada en 220 nm, ya que los ácidos orgánicos como el AGlu suelen presentar máximos de absorbancia cercanos a esa longitud de onda, debido a la presencia de los grupos carboxilos (63). Por su parte, azúcares como la glucosa no suelen presentar señales en este tipo de detectores, por lo

que este compuesto no se tomó en cuenta para la selección preliminar de la longitud de onda del análisis. Por el contrario, se esperaba que este compuesto solo fuera detectado efectivamente por el detector RID. Los resultados de estas pruebas preliminares de detección se observan en la Figura 14.

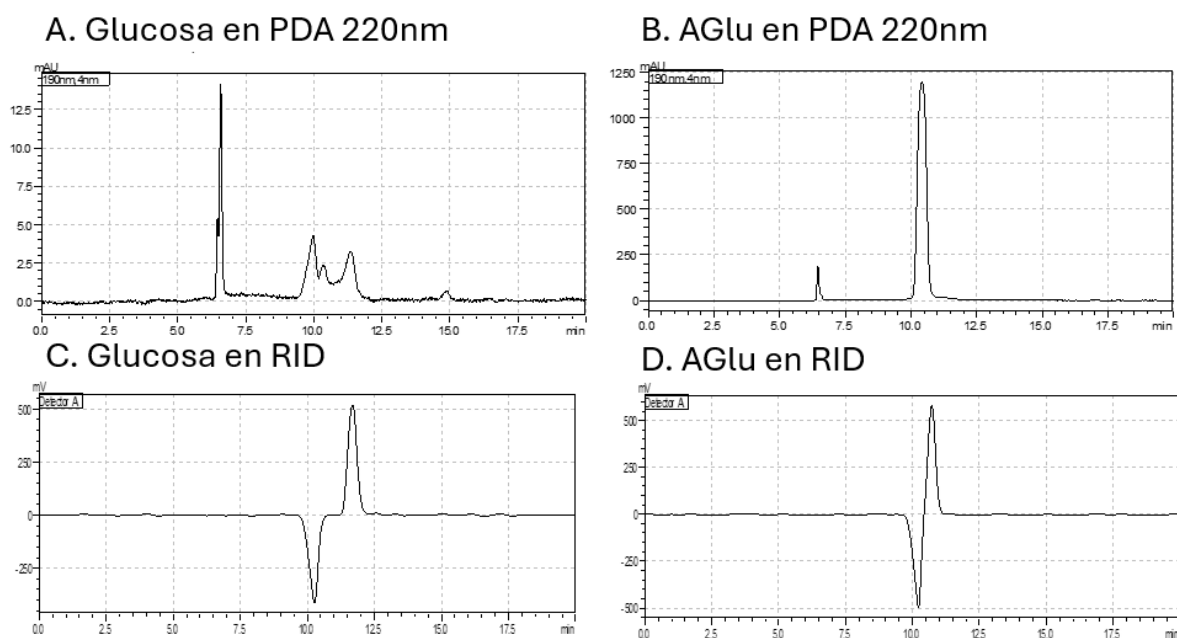


Figura 14. Detección de glucosa y AGlu por HPLC. **(A)** Cromatograma de un estándar de glucosa 20 g/L obtenido utilizando el detector PDA (220 nm), **(B)** Cromatograma de un estándar de AGlu 20 g/L obtenido utilizando el detector PDA (220 nm), **(C)** Cromatograma de un estándar de glucosa 20 g/L obtenido utilizando el detector RID, **(D)** Cromatograma de un estándar de AGlu 20 g/L obtenido utilizando el detector RID.

Como primera observación, se puede decir que la metodología planteada permite la detección de ambos compuestos por HPLC, observando la aparición de picos definidos para ambos compuestos en al menos uno de los detectores ensayados. Se determinó que en esta separación se obtienen mejores señales utilizando el detector RID para glucosa, obteniendo un pico bien definido con un tiempo de retención de 11,3 min. Utilizando el detector PDA, por otro lado, se observa únicamente ruido. Como se mencionó anteriormente, se esperaba obtener una mejor señal con el detector RID, debido a que este detector suele utilizarse para los azúcares. Esto se debe a que los azúcares no presentan grupos cromóforos que absorban en el rango UV-VIS, pero si cambian el índice de refracción de una solución cuando están presentes. Por otro lado, para AGlu, se logró obtener señal en ambos detectores, con picos definidos con tiempo de retención de 10,1 min (para PDA) y 10,8 min (para RID). Sin embargo, la señal obtenida en el detector PDA fue mayor. Los tiempos de retención diferenciales obtenidos para ambos

compuestos indican que esta metodología permitiría la correcta separación de estos componentes en las muestras de biotransformaciones.

Para confirmar que la longitud de onda elegida para la detección de AGlu por PDA era efectivamente la indicada para visualizar correctamente el pico de interés, se decidió analizar el espectro de absorción del compuesto (Figura 15).

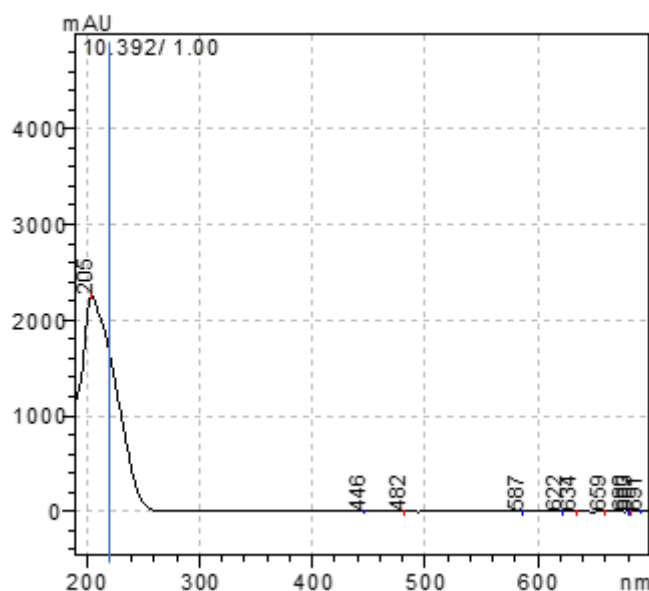


Figura 15. Espectro de absorción para AGlu utilizando el detector PDA. En azul se indica la absorción a 220 nm.

El análisis del espectro de absorción del AGlu demostró que el pico de absorción máxima se encuentra a los 205 nm, aunque el compuesto presenta absorción en un rango más amplio, que abarca desde los 190 a los 258 nm. Sin embargo, llevar a cabo la detección de un compuesto a longitudes de onda cercanas al límite de emisión de la lámpara del detector (190 nm) en general no es recomendable, ya que el cromatograma obtenido puede presentar ruido. Esto dificulta la detección de los picos, especialmente en muestras donde el compuesto objetivo se presenta en bajas concentraciones. Por esta razón, se decidió continuar trabajando a 220 nm, una longitud de onda más alejada del límite de emisión de la lámpara que igualmente presenta un nivel de señal adecuado para la detección del compuesto.

Con el método ya comprobado, los tiempos de retención establecidos y los detectores a utilizar para analizar los picos seleccionados de acuerdo a las señales obtenidas, se realizaron las curvas de calibración para ambos compuestos (Figuras 16 y 17). Para ello, se generó una solución con ambos estándares con una concentración de 20 g/L de glucosa y 20 g/L de AGlu, a la cual se le

realizaron diluciones seriadas hasta alcanzar una concentración de 0,31 g/L para cada componente. Las mezclas de estándares fueron luego analizadas por HPLC.

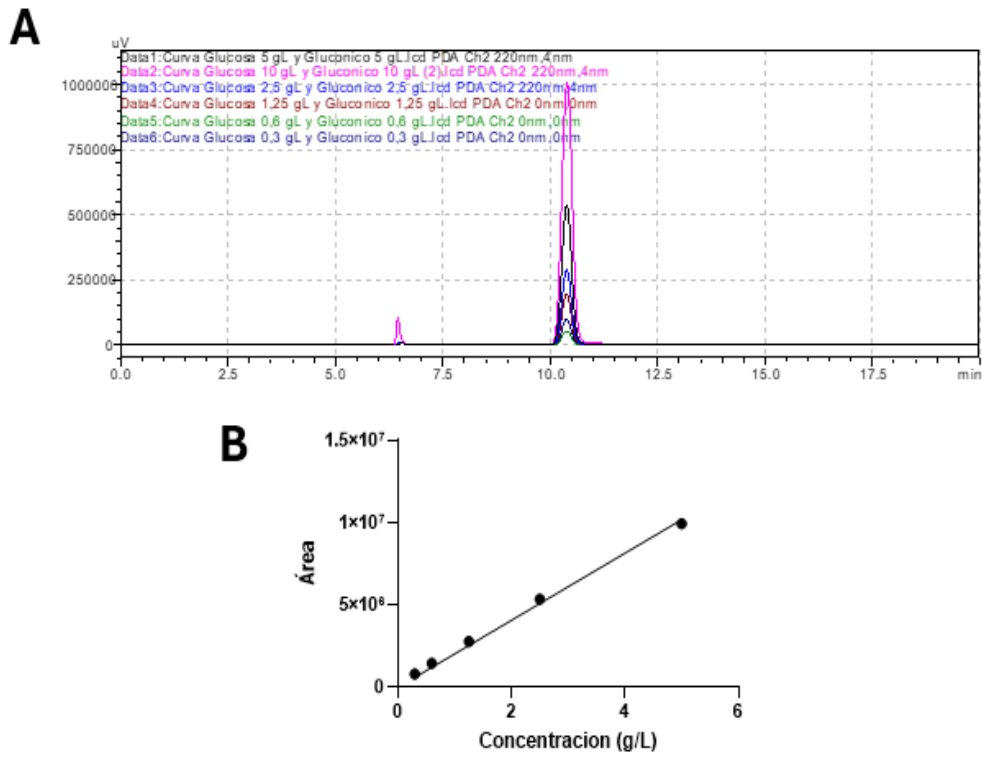


Figura 16. (A) Cromatogramas de los distintos estándares utilizados para la construcción de la curva de calibración de AGlu (0,31 g/L – 5 g/L), obtenidos utilizando el detector PDA (220 nm). (B) Curva de calibración de AGlu, donde se obtuvo una ecuación de la recta $y = 2039344x$, con un $R^2 = 0,99$.

Para construir la curva de calibración de AGlu, se consideraron los datos obtenidos a partir de concentraciones menores a 5 g/L inclusive debido a que, a mayores concentraciones de este compuesto, la señal comenzaba a saturarse. Esto produce una pérdida en la relación lineal entre el área obtenida y la concentración del compuesto. En otras palabras, la utilización de esos datos en la curva provocaría una subestimación de la concentración real de AGlu presente en una solución.

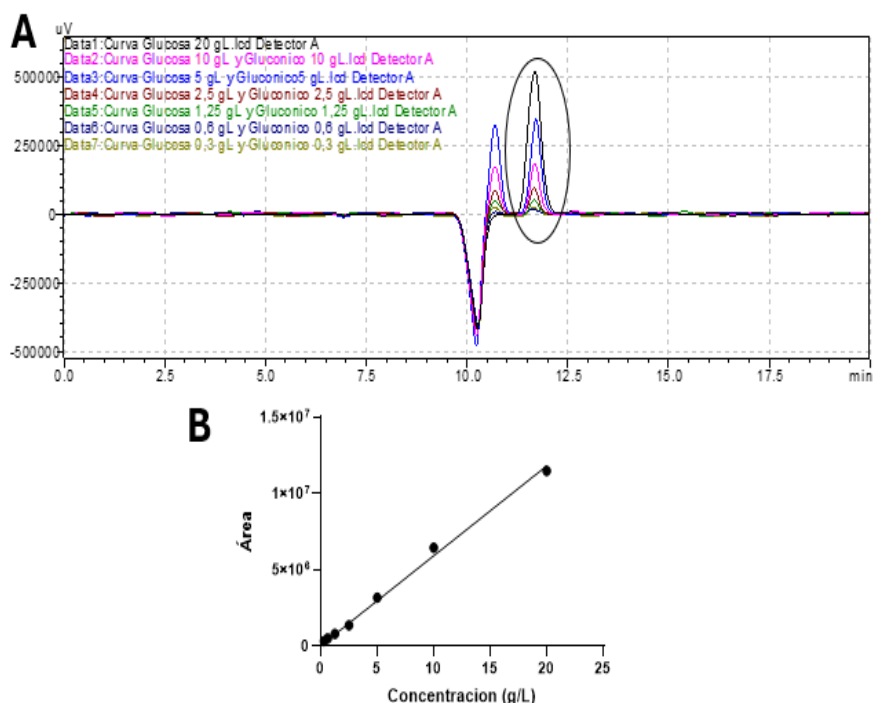


Figura 17. (A) Cromatogramas de los distintos estándares utilizados para la construcción de la curva de calibración de glucosa (0,31 g/L – 20 g/L), obtenidos utilizando el detector RID. El pico correspondiente a la glucosa se observa a los 11,3 min. El pico anterior (10,4 min) corresponde al AGlu. (B) Curva de calibración de glucosa, donde se obtuvo una ecuación de la recta $y = 589445x$, con un $R^2 = 0,99$.

Para construir la curva de calibración de glucosa, se consideraron los datos obtenidos a partir de todos los estándares ensayados, ya que el rango lineal se mantuvo en todo el rango de concentraciones entre 0,31 y 20 g/L.

Los resultados obtenidos durante los ensayos de HPLC demostraron que la metodología previamente propuesta por el grupo de investigación para el análisis de otros sustratos y productos de oxidación de *Gluconobacter*, es también adecuada para la correcta separación y cuantificación de la glucosa y el AGlu. Como se mencionó anteriormente, este protocolo es el mismo que se utiliza para la separación y detección de glicerol, DHA y GA. Esto resulta ventajoso de cara al análisis en conjunto de muestras de conversiones partiendo de los dos sustratos en estudio, ya que las condiciones iguales de separación hacen que las muestras pueden ser inyectadas en el equipo de forma continua, sin necesidad de pasos de limpieza y equilibrado intermedios. Esto agiliza el análisis, acortando los tiempos de procesamiento.

Una vez determinado el método de detección de glucosa y AGlu, se procedió a comenzar con el estudio de la oxidación de este sustrato por células en reposo de GCHM43. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

4.3.1.2. Estudio del efecto de la fase de crecimiento en el que se colectan las células en la biotransformación de glucosa

En esta primera aproximación experimental se buscó probar si existen diferencias en la producción del compuesto de interés AGlu, utilizando células en reposo colectadas en distintas fases del crecimiento bacteriano. Para el diseño de este ensayo, se utilizó como base la curva de crecimiento de GCHM43 en medio GG a 30°C, debido a que anteriormente se determinó que los inóculos serían generados a esta temperatura por los mejores rendimientos obtenidos frente a los cultivos incubados a 37°C.

Se realizó un cultivo en las mismas condiciones que se llevó a cabo en el estudio del crecimiento a 30°C, para obtener pellets bacterianos que se correspondiesen con tres momentos diferentes del crecimiento (Figura 18). Estos fueron la mitad de la fase exponencial (F1, $DO_{600nm} = 1,8$), la fase exponencial tardía (F2, $DO_{600nm} = 3,0$) y la fase estacionaria (FE, $DO_{600nm} = 3,5$).

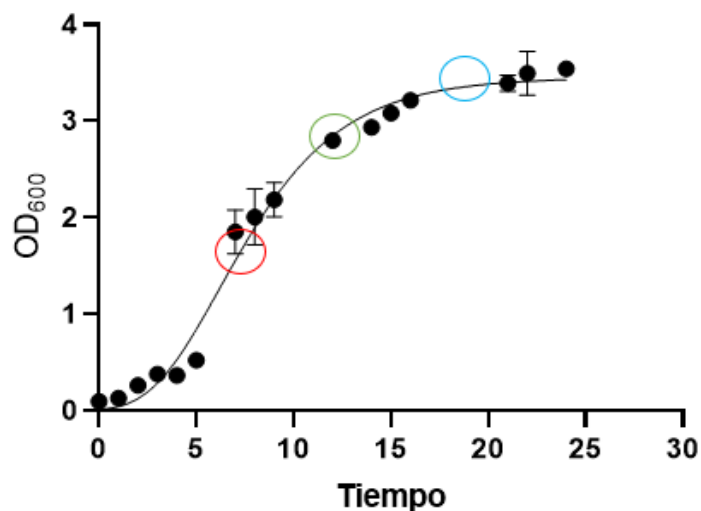


Figura 18. Selección de condiciones experimentales para la obtención de células para ensayos de biotransformación utilizando células en reposo colectadas durante distintas fases del crecimiento. Los círculos representan las distintas fases del crecimiento seleccionadas para colectar las células utilizadas para las conversiones. **(F1)** Mitad de fase exponencial (círculo rojo). **(F2)** Fase exponencial tardía (círculo verde). **(FE)** Fase estacionaria (círculo celeste). La curva posee un $R^2 = 0,984$

Idealmente, en los cultivos previos a la obtención de células en reposo, se busca alcanzar altas concentraciones de biomasa que a su vez, presente una elevada actividad catalítica. Por esta razón, las células fueron colectadas en distintos puntos tanto de la fase exponencial como de la fase estacionaria del crecimiento. Por su parte, se decidió no realizar ensayos con bacterias en la fase lag del crecimiento debido a que en esta fase las bacterias se encuentran principalmente adaptándose al medio donde se encuentran, y aún no se encuentran multiplicándose. Por lo tanto, se espera que su metabolismo se encuentre menos activo. Además, utilizar bacterias en esta fase inicial del crecimiento carece de sentido desde una perspectiva industrial, dado que el rendimiento de biomasa en este punto es muy bajo.

Los ensayos de conversión se llevaron a cabo en presencia de glucosa 50 g/L y 1 g/L de bacteria, incubando placas de 24 pocillos con 1,5 mL de volumen de reacción a 30 y 37°C, por 24 h. La concentración de glucosa y la concentración de células seleccionada para estos ensayos preliminares fue basada en los resultados obtenidos por Lian et al, en un trabajo donde se llevó a cabo la conversión de glucosa a AGlu por *G. oxydans* HG19 partiendo de distintas concentraciones iniciales de sustrato y células, utilizando matraces agitados (64). En el mismo, la concentración de 50 g/L de glucosa fue consumida efectivamente en menos de 24 h, en reacciones con valores de DO_{600nm} inicial de entre 2 y 4. Utilizando la curva de peso seco obtenida anteriormente para GCHM43 y realizando un promedio, la cantidad de bacterias empleada para obtener estos resultados equivaldría a aproximadamente 1 g/L.

Una vez culminado el ensayo, se analizaron las distintas muestras obtenidas por HPLC. A modo de ejemplo se presentan a continuación los cromatogramas correspondientes a los tiempos inicial y final de una de las réplicas experimentales de conversión con células en la fase F2 del crecimiento. En el cromatograma correspondiente al tiempo inicial, solo se logró observar el pico de la glucosa, con un tiempo de retención de 11,3 min (Figura 19). Por otro lado, a las 24 h se logra observar la presencia del pico de AGlu, con un tiempo de retención de 10,1 min, acompañado de un pico más pequeño, con un tiempo de retención de 9,6 min. La aparición de este pico se observó en todas las condiciones ensayadas, tanto al variar el inóculo celular, como variando la temperatura de la reacción.

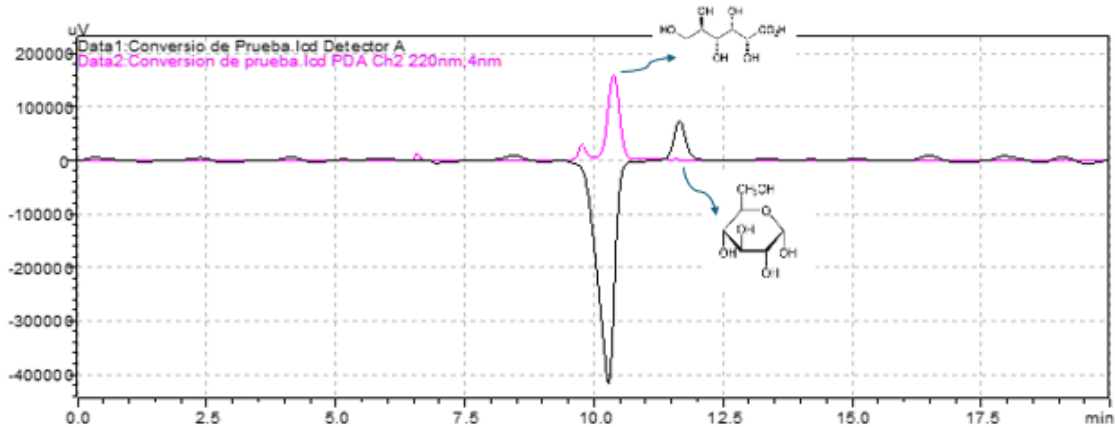


Figura 19. Conversión con GCHM43, utilizando como sustrato glucosa 50 g/L y 1 g/L de bacteria (colectadas en F2), incubado a 30°C. Tiempo inicial (negro, detector RID). Tiempo final (rosa, detector PDA, 220 nm). C9,6 (Tret = 9,6 min). AGlu (Tret = 10,1 min). Glucosa (Tret = 11,7 min).

La aparición de este pico, según Kataoka et al, puede estar asociada a la oxidación del AGlu por parte de GCHM43, obteniendo otro producto alternativo. En su estudio, los autores describen las dos vías por las cuales las bacterias del género *Gluconobacter* pueden oxidar la glucosa (Figura 20) ([65]).

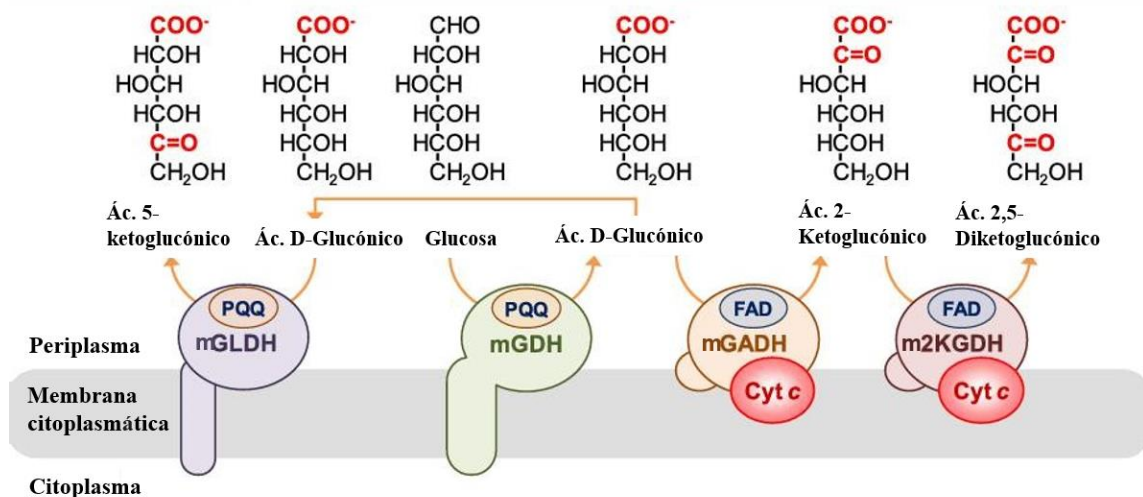


Figura 20. Producción de ácidos ketoglucónicos en cepas de *Gluconobacter*. Adaptado de Kataoka et al ([65]). mGDH (glucosa deshidrogenasa), mGLDH (glicerol deshidrogenasa), mGADH (gluconato deshidrogenasa), m2KGDH: 2-ketogluconato deshidrogenasa.

Ambas vías comienzan con la conversión de glucosa a AGlu (también llamado gluconato), por acción de mGDH. Una vez obtenido el AGlu, este puede ser convertido en ketoácidos

orgánicos, como el ácido 5-ketoglucónico (5-KGA), por acción de la enzima mGLDH o el ácido 2-ketoglucónico (2-KGA) por acción de la enzima mGADH. Por esta última vía, el 2-KGA puede ser convertido en ácido 2,5 diketo-glucónico (2,5-KGA) en algunas especies, por acción de la enzima m2KGDH. La acumulación de uno u otro ácido en biotransformaciones catalizadas por *Gluconobacter* dependerá de la actividad enzimática presentada por las distintas cepas. Cabe destacar que todos estos ácidos orgánicos constituyen productos de valor agregado, con diversas aplicaciones industriales (66–68).

En base a lo antes mencionado, es probable que el pico obtenido pertenezca a uno, o quizás a más de uno de estos ácidos orgánicos. Según lo mejor de nuestro conocimiento, no existen ensayos previos que hayan reportado la formación de ninguno de los productos de oxidación del AGlu por biotransformación con GCHM43, por lo que en esta instancia no se puede determinar de qué derivado se trata.

Para determinar la identidad del compuesto asociado al pico que aparece a los 9,6 min se deberá, por ejemplo, llevar a cabo el análisis de estándares de los ácidos potencialmente formados por HPLC, comparando así sus tiempos de retención. Sin embargo, para llevar a cabo una identificación precisa de los mismos se deberán realizar análisis como resonancia magnética nuclear (RMN) o espectrometría de masas. La RMN funciona aplicando un campo magnético a un núcleo atómico, lo que provoca que los núcleos resuenen a ciertas frecuencias. Al medir esta resonancia, se puede obtener información detallada sobre la estructura molecular y el entorno químico de los átomos en una sustancia (69). Por otro lado, la espectrometría de masas funciona ionizando moléculas y separando los iones resultantes, por su relación masa/carga, posibilitando la identificación y cuantificación de los compuestos presentes en una muestra (70).

Dado que al momento de realizar esta Tesis no se contaba con los estándares necesarios de los ácidos ni con la capacidad de realizar los análisis por RMN o espectrometría de masas, el análisis del compuesto asociado al pico con tiempo de retención 9,6 min se llevará a cabo en base a su área. Si bien este análisis no permite obtener datos certeros de concentración, sí facilita la comparación entre los distintos ensayos y permite observar patrones de formación del compuesto en estudios de cinética. En adelante, para hacer su referencia más sencilla, este compuesto no identificado será denominado C9,6. Futuros experimentos deberán centrarse en su correcta identificación y cuantificación.

Luego de que las distintas señales obtenidas en los cromatogramas correspondientes a las reacciones fueron descritas e identificadas (en el caso de la glucosa y el AGlu), se procedió con el análisis cuantitativo de la conversión de glucosa con las bacterias colectadas en diferentes fases de crecimiento (Figura 21).

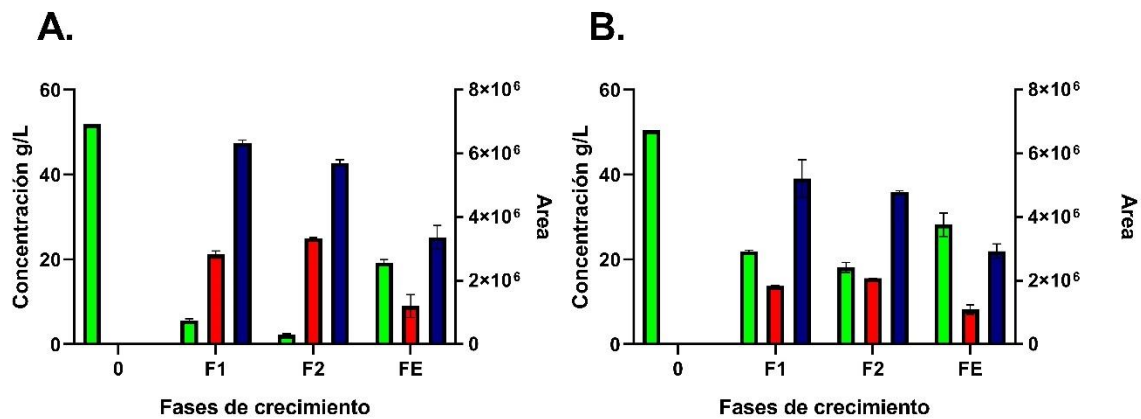


Figura 21. Análisis del efecto de utilizar células en reposo de GCHM43 colectadas en diferentes fases de crecimiento en la conversión de glucosa a AGlu y C9,6 luego de 24 h, en reacciones incubadas a diferentes temperaturas. (A) 30°C. (B) 37°C. F1 (Mitad de fase exponencial. F2 (Fase exponencial tardía). FE (Fase estacionaria). Glucosa (Verde, g/L). AGlu (Rojo, g/L). C9,6 (Azul, Área).

Se observaron diferencias en cuanto a la conversión a productos y consumo de sustrato por parte de las bacterias en las distintas fases de crecimiento. Sin embargo, cabe destacar que se logró ver consumo de sustrato y generación de producto en todas las condiciones estudiadas, confirmando que GCHM43 es capaz de oxidar la glucosa tanto a 30 como a 37°C.

Una primera observación de los resultados muestra que las bacterias colectadas en fase estacionaria (FE) presentan un menor consumo de sustrato y una menor conversión a los productos (AGlu y C9,6) con respecto a las otras dos condiciones estudiadas, en las que se utilizaron bacterias colectadas a distintos tiempos de la fase exponencial (F1 y F2). Este efecto se observa en las dos condiciones de temperatura estudiadas.

Esta menor capacidad de conversión de las bacterias colectadas en la FE podría deberse a que está postulado que las BAA como GCHM43 presentan dos etapas durante su crecimiento, donde se observan cambios significativos en su metabolismo (58). En una primera etapa, se focalizan

en la fermentación oxidativa para la producción de energía a través de la oxidación de carbohidratos por las distintas enzimas deshidrogenasas de membrana, liberando los productos al medio. Esto genera que muy pocos de los carbohidratos que se encuentran en el medio sean canalizados hacia el metabolismo central (procesos que se dan a nivel citoplasmático). Esta primera etapa del crecimiento coincidiría con la fase exponencial (F1 y F2). Por otra parte, cuando las bacterias entran en la FE, comienzan a derivar estos carbohidratos hacia el metabolismo central. En ese entendido, la actividad de las deshidrogenasas de membrana disminuye, lo que se traduce en una menor formación de producto.

Analizando en términos de concentración de AGlu obtenido, a 30°C se obtuvieron $9,7 \pm 2,7$ g/L del compuesto utilizando bacterias colectadas en la FE, mientras que para las reacciones con bacterias colectadas en F1 y F2 se obtuvieron $21,2 \pm 0,9$ g/L y $25,0 \pm 0,2$ g/L, respectivamente. Por otro lado, las áreas de C9,6 fueron de 6324545 ± 101618 para F1, 5702800 ± 103859 para F2, y por último, 3363395 ± 372539 para FE. Estos valores ilustran la notoria diferencia que se obtuvo en los ensayos de conversión con las células colectadas en las fases F1 y F2, y los obtenidos para las células colectadas en la FE. Por otro lado, mientras que a 37°C se observa una tendencia similar, las diferencias de producción por las células correspondientes a las distintas fases no son tan marcadas. Para la FE, se obtuvieron $8,2 \pm 0,1$ g/L de AGlu, mientras que para F1 y F2 se obtuvieron $13,5 \pm 0,2$ g/L y $15,5 \pm 0,1$ g/L respectivamente. En el caso de C9,6, las áreas obtenidas fueron de 5209880 ± 596006 para F1, 4799485 ± 33778 para F2 y 2930095 ± 225418 .

En suma, si bien las tendencias de consumo de sustrato y formación de producto para las células colectadas en las distintas fases de crecimiento siguen un patrón similar entre temperaturas, cuantitativamente tanto el consumo de sustrato como la aparición de AGlu y C9,6 fue menor a 37°C. Considerando que la temperatura óptima de esta cepa ronda los 30-33°C, es posible que las enzimas involucradas en la obtención de estos compuestos presenten mayores actividades a 30°C que a 37°C. Estos resultados indican que aunque la cepa es termotolerante, esto no implica necesariamente un rendimiento uniforme a todas las temperaturas.

Considerando que las células colectadas durante la fase F2 presentaron mejor consumo de sustrato y una mayor producción del compuesto cuantificable AGlu, se decidió seleccionar las bacterias seleccionadas en esta fase para los experimentos siguientes. Asimismo, la utilización de bacterias colectadas en la fase F2 tiene mayor sentido industrial, ya que los rendimientos de

biomasa obtenidos durante la misma son más elevados que aquellos obtenidos en las otras fases del crecimiento evaluadas.

4.3.1.3. Estudio del efecto de la concentración bacteriana en la biotransformación de glucosa

La concentración bacteriana es un factor crítico en los procesos de biotransformación. Estudios previos han demostrado que la eficiencia de la conversión mejora cuando se utiliza una concentración óptima de bacterias (71). Una concentración demasiado baja puede resultar en una menor eficiencia de conversión, mientras que una concentración excesivamente alta puede causar saturación y competencia entre las bacterias, lo que también reduce la eficiencia.

Para este fin, se llevaron a cabo conversiones utilizando distintas concentraciones de GCHM43. Se seleccionaron tres condiciones (1 g/L, 2 g/L y 10 g/L) con el objetivo de evaluar los posibles efectos de las mismas en la eficiencia de conversión. Nuevamente, el ensayo se realizó incubando las placas tanto a 30 como 37°C por 24 h (Figura 22).

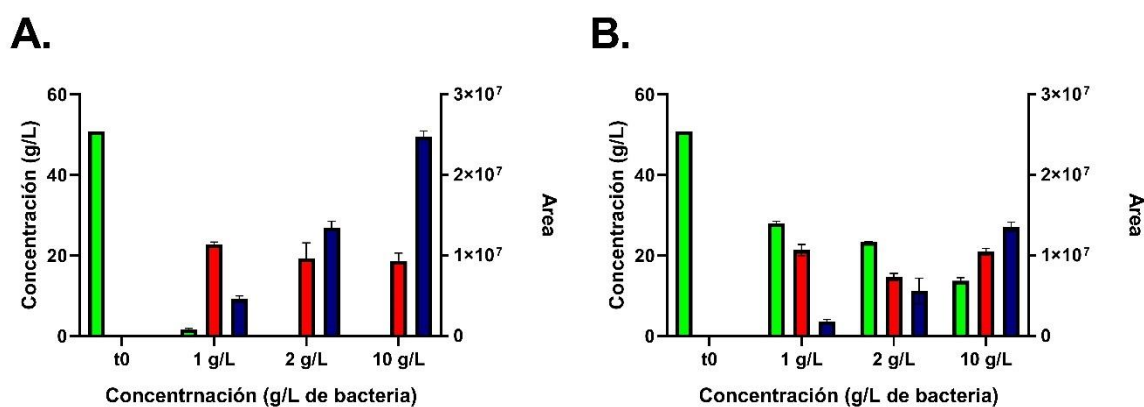


Figura 22. Análisis del efecto de utilizar distintas concentraciones de células en reposo de GCHM43 en la conversión de glucosa a AGlu y C9,6 luego de 24 h, en reacciones incubadas a diferentes temperaturas. (A) 30°C. (B) 37°C. Glucosa (Verde, g/L). AGlu (Rojo, g/L). C9,6 (Azul, Área).

En los resultados observados en la Figura 22, se observa que la concentración bacteriana utilizada en las reacciones no tiene grandes implicancias en la producción de AGlu en el rango estudiado, para ninguna de las dos temperaturas ensayadas.

En los ensayos llevados a cabo a 30°C (Figura 22A), se observa que para la condición de 1 g/L se obtuvieron $22,7 \pm 0,6$ g/L del compuesto, mientras que para las condiciones de 2 g/L y 10

g/L de células, se obtuvieron $19,3 \pm 3,3$ g/L y $18,7 \pm 1,8$ g/L del mismo, respectivamente. Considerando los errores asociados a las medidas, se puede considerar que las concentraciones de AGlu obtenidas en las distintas condiciones presentan un alto nivel de similitud. Asimismo, para la mayoría de los casos probados, se dio un consumo total del sustrato, exceptuando el ensayo en el que se utilizaron 1 g/L de células. Este resultado fue comparable con el obtenido en el apartado anterior, en el ensayo llevado a cabo en las mismas condiciones. Donde sí se observa una diferencia notoria, es en el área correspondiente al compuesto C9,6 obtenida para cada caso. A medida que aumenta la concentración bacteriana, aumenta el área asociada a este compuesto obtenida luego de 24 h.

En cuanto a los resultados obtenidos a 37°C , se observa que para la condición 1 g/L de células se obtienen $21,3 \pm 1,4$ g/L de AGlu, mientras que para las condiciones 2 g/L y 10 g/L de células, la producción fue de $14,6 \pm 0,8$ g/L y $20,9 \pm 0,82$ g/L, respectivamente. En comparación a lo obtenido a 30°C , se observa que los resultados de producción de AGlu son similares. Se puede apreciar que no todo el sustrato es consumido en el proceso de conversión. A pesar del incremento en la concentración de células de GCHM43, una parte significativa de la glucosa permanece sin convertir después de 24 h de incubación. Esto sugiere que, a esta temperatura la eficiencia de conversión probablemente disminuye. Por otro lado, en la producción de C9,6, se observa un patrón similar a lo observado previamente a 30°C . A pesar de que las áreas son menores a las obtenidas a esa temperatura, a 37°C la producción de C9,6 aumenta considerablemente a medida que la concentración de bacterias incrementa.

El fenómeno mencionado sugiere que el compuesto C9,6 es efectivamente un producto de la oxidación del AGlu. Mientras que la formación de AGlu se mantuvo constante en los distintos ensayos, la producción de C9,6 a las 24 horas aumentó en función de la concentración de bacterias utilizada en la conversión. Este aumento en la concentración bacteriana probablemente acelera la velocidad de consumo del sustrato y, consecuentemente, la formación de productos. Dado que C9,6 probablemente se forma a partir de AGlu, el incremento en la velocidad de conversión se refleja en la mayor producción de este compuesto. La concentración de AGlu se mantendría constante debido a que la velocidad de su formación a partir de glucosa y su conversión a C9,6 serían similares. Sin embargo, al no disponer de estándares para determinar la concentración de C9,6, resulta imposible realizar un balance de masas preciso durante los ensayos, lo que complica la validación experimental de esta hipótesis. No obstante,

un estudio cinético que permita seguir la aparición y desaparición de los distintos compuestos a lo largo del tiempo podría esclarecer el fenómeno observado.

En función de lo discutido, se decidió continuar los experimentos utilizando 2 g/L de bacterias, basado en los resultados obtenidos a 30°C. En estas condiciones se observó una conversión total de la glucosa inicial, lo que no ocurrió con la concentración menor de 1 g/L. Aunque la concentración de glucosa consumida fue total a 10 g/L, la concentración final de AGlu fue similar a la obtenida con 2 g/L. Si bien la producción del compuesto C9,6 fue mayor a 10 g/L de bacterias, debido a que su identificación y cuantificación no son posibles en esta etapa, se decidió priorizar la formación de AGlu. Desde un punto de vista industrial, los resultados similares en la producción de AGlu a 2 g/L y 10 g/L de bacterias no justifican el incremento en la concentración de biocatalizador.

Una vez determinada la concentración de bacterias a utilizar en las reacciones, se prosiguió a estudiar el efecto de la concentración inicial de sustrato en las conversiones.

4.3.1.4. Estudio del efecto de la concentración inicial de sustrato en la biotransformación de glucosa

Por último, se estudió la influencia de la concentración inicial de sustrato en el medio de reacción. Una cuidadosa selección de la concentración de glucosa inicial influye significativamente en la maximización de la eficiencia del proceso y evitar la inhibición por sustrato. El uso de altas concentraciones de glucosa inicial ha probado tener un efecto negativo sobre la producción de AGlu por otras especies de *Gluconobacter* (64). Sin embargo, mientras menor sea la concentración de sustrato inicial, menor será la concentración de producto alcanzada. Esto no sería redituable a nivel económico para una industria, debido a que, para obtener grandes cantidades de producto, sería necesario realizar varios ciclos productivos.

Por estas razones, se decidió realizar este experimento analizando la influencia de la concentración de sustrato inicial, para la conversión a AGlu. Para ello, se procedió a realizar conversiones variando la concentración de sustrato (15 g/L, 50 g/L, 70 g/L y 120 g/L) durante 24 h. Cada concentración, se probó tanto para 30°C (Figura 23) como para 37°C (Figura 24). En esta oportunidad, se decidió además analizar la conversión a lo largo del tiempo, con la finalidad de elucidar la cinética de consumo de sustrato y formación de producto.

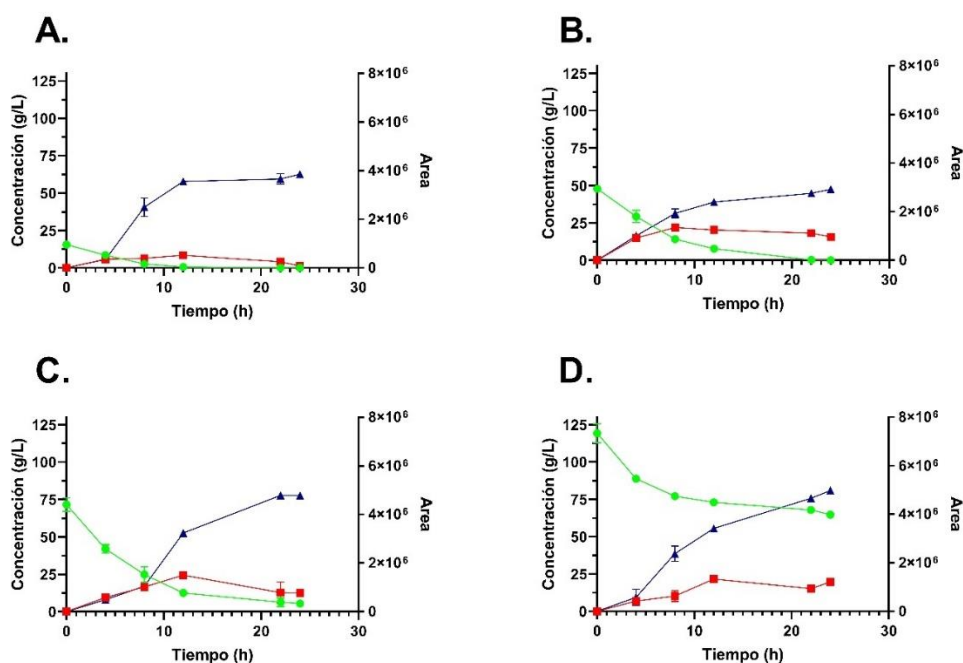


Figura 23. Análisis del efecto de utilizar distintas concentraciones iniciales de sustrato en la conversión de glucosa a AGlu y C9,6 por células en reposo de GCHM43 a 30 °C. (A) 15 g/L. (B) 50 g/L. (C) 70 g/L. (D) 120 g/L. Glucosa (Verde, g/L). AGlu (Rojo, g/L). C9,6 (Azul, Área).

Al analizar los resultados presentados en la Figura 23, se observó que la concentración inicial de sustrato tiene un efecto en la conversión obtenida hacia los productos. A la concentración más baja de glucosa inicial ensayada, 15 g/L, se obtuvo una concentración máxima de AGlu de $8,4 \pm 0,3$ g/L, a las 12 h de comenzado el ensayo. Al tomar las muestras a distintos tiempos, se obtuvieron resultados más claros en cuanto a las cinéticas de obtención de productos y el consumo de sustrato. La concentración de AGlu, crece hasta alcanzar una meseta, sin superar la concentración antes mencionada. Una vez alcanzado este máximo y consumido totalmente el sustrato, el AGlu comienza a consumirse hasta desaparecer por completo del medio de reacción. Por su parte, el pico correspondiente al compuesto C9,6, aumenta desde el inicio de la reacción hasta alcanzar una meseta, perdurando en el medio de reacción luego del consumo total de la glucosa y el AGlu. Este tipo de cinética es consistente con la hipótesis antes mencionada sobre la posibilidad de que el pico C9,6 sea un producto de la oxidación de la glucosa. De hecho, comportamientos similares fueron observados anteriormente por otros autores, en donde utilizaron distintas cepas de *Gluconobacter* para oxidar glucosa donde se obtuvo no solamente AGlu, sino también sus productos de oxidación 2-KGA ([71]y 5- KGA [68].

En los ensayos con concentraciones iniciales de glucosa de 50 y 70 g/L, se observó una mayor producción de AGlu en comparación con la obtenida a partir de 15 g/L. A las 8 y 12 horas, las concentraciones alcanzaron $20,4 \pm 2,1$ g/L y $24,4 \pm 0,1$ g/L para las reacciones iniciadas con 50 y 70 g/L, respectivamente. En ambos casos se evidencia la meseta observada en la concentración de AGlu, que sobre el final de la reacción comienza a disminuir, acompañando el consumo del sustrato glucosa. Por su parte, en ambos casos, la producción de C9,6 se da a lo largo de toda la reacción, alcanzando un área mayor en la reacción en la que se partió de 70 g/L de sustrato inicial.

Por último, para los ensayos de conversión partiendo de 120 g/L de glucosa la máxima producción de AGlu fue de $21,6 \pm 1,6$ g/L, un valor que se encuentra cercano a los resultados máximos obtenidos para las concentraciones intermedias de sustrato. Sin embargo, en estas condiciones se obtiene la mayor concentración de sustrato remanente luego de 24 h de reacción ($64,7 \pm 1,0$ g/L). Es probable que el tiempo de reacción estudiado haya sido insuficiente, ya que en el gráfico se observa que sobre el final de la reacción el consumo de sustrato aún presenta una tendencia a disminuir, mientras que la formación de C9,6 presenta una tendencia hacia el aumento. Asimismo, el hecho de que la meseta en la concentración de AGlu se mantuvo indica que al momento de la toma de la última muestra se continuaba con la formación de ambos productos.

Por otro lado, los resultados de las reacciones llevadas a cabo a 37°C, como se mencionó anteriormente, se presentan en la Figura 24.

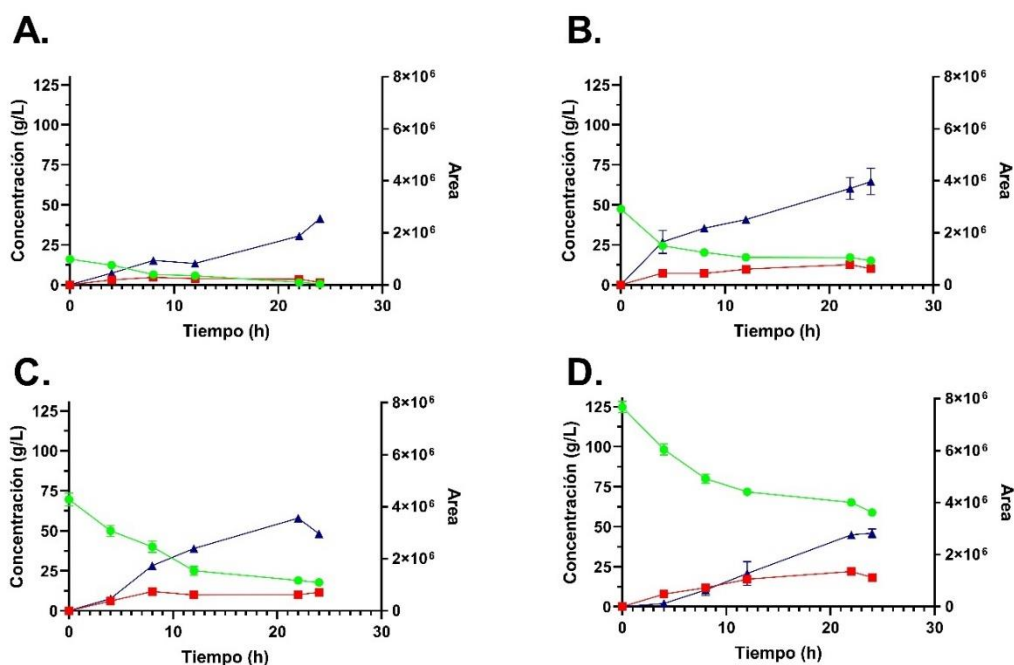


Figura 24. Análisis del efecto de utilizar distintas concentraciones iniciales de sustrato en la conversión de glucosa a AGlu y C9,6 por células en reposo de GCHM43 a 37 °C. (A) 15 g/L. (B) 50 g/L. (C) 70 g/L. (D) 120 g/L. Glucosa (Verde, g/L). AGlu (Rojo, g/L). C9,6 (Azul, Área).

Para la conversión iniciada con 15 g/L de glucosa, los resultados obtenidos para la concentración máxima de AGlu registrada son bajos en comparación con los obtenidos a 30°C, alcanzando $4,8 \pm 0,3$ g/L a las 12 h. Igualmente se observó la formación del compuesto C9,6, nuevamente consumiendo completamente el AGlu al final de la reacción. La formación de C9,6 en términos de área también fue menor que a 30°C, y por la forma de la curva obtenida se evidencia una formación más lenta de este compuesto. De entre todas las condiciones ensayadas a esta temperatura, solo partiendo de 15 g/L de sustrato se consiguió obtener un consumo total del mismo.

Para las concentraciones medias de sustrato inicial ensayadas, también se observaron conversiones más bajas con respecto a las obtenidas a 30°C. Las concentraciones máximas de AGlu fueron de $18,8 \pm 0,9$ g/L y $11,5 \pm 0,7$ g/L, obtenidas a las 12 y 24 h de reacción, para 50 g/L y 70 g/L, respectivamente. En concordancia, tanto la producción de C9,6 como el consumo de sustrato fueron también menores en ambos casos.

A 120 g/L, la producción máxima de AGlu fue de $21,6 \pm 0,7$ g/L, y fue alcanzada a las 22 h. Nuevamente, partiendo de esta concentración de sustrato no se logró obtener un consumo total.

Dado el gran volumen de datos obtenido en este ensayo, se realizó una tabla comparativa con datos relevantes de los experimentos realizados (Tabla 8). Esto se hizo para determinar las mejores condiciones de producción de AGlu, con la finalidad de utilizarlas en una reacción posterior a mayor escala. Como se mencionó anteriormente, dado que el compuesto C9,6 no pudo ser ni identificado ni cuantificado durante este trabajo, la maximización de su producción no fue considerada en esta instancia.

Tabla 8. Máximas producciones de AGlu por ensayo, para la determinación de las mejores condiciones.

Temperatura (°C)	Conc. de sustrato inicial (g/L)	Conc. máxima de producto (g/L)	Tiempo para conc. máxima de producto (g/L)	Productividad (g/L.h)	% Conversión de sustrato
30	15	8,4 ± 0,3	12	0,7 ± 0,1	95,8 ± 0,3
30	50	20,4 ± 2,1	8	2,55 ± 0,3	89,1 ± 0,6
30	70	24,4 ± 0,1	12	2,2 ± 0,03	82,1 ± 0,3
30	120	21,6 ± 1,6	12	1,6 ± 0,10	46,1 ± 0,7
37	15	4,8 ± 0,3	12	0,4 ± 0,10	56,9 ± 0,2
37	50	18,8 ± 0,9	12	1,6 ± 0,01	65,8 ± 0,2
37	70	11,5 ± 0,7	22	0,5 ± 0,10	75,3 ± 0,3
37	120	21,6 ± 0,7	22	1,0 ± 0,01	45,7 ± 0,7

Para la elección de las mejores condiciones, se tomó en cuenta tanto la productividad de AGlu, como el porcentaje de conversión del sustrato en el punto de concentración máxima de este producto. La mayor productividad de AGlu fue obtenida en la reacción a 30°C en la que se partió de 50 g/L de glucosa, siendo 2,55 ± 0,3 g/L.h. En estas condiciones, se obtuvo además una alta conversión de sustrato (89,1 ± 0,6%). Por este motivo se decidió seleccionar estas

condiciones experimentales para el ensayo siguiente, que consistió en una primera aproximación al escalado de esta reacción.

4.3.1.5. Biotransformación de glucosa a escala de matraces

Llevar a cabo estudios de escalado del proceso desarrollado para la biotransformación de glucosa utilizando células en reposo de GCHM43, es de suma importancia para evaluar su aplicabilidad industrial. Como se detalló anteriormente, en el estudio preliminar de esta reacción se realizaron una serie de ensayos a pequeña escala utilizando placas de 24 pocillos. Esta aproximación fue elegida por su practicidad en esta etapa de la investigación, ya que permitió evaluar varias condiciones simultáneamente y asegurar un tratamiento uniforme de los experimentos. Sin embargo, esta estrategia tiene como desventaja que la aireación en este tipo de placas puede resultar insuficiente, lo que podría afectar los rendimientos de biotransformación de *Gluconobacter*.

Por esta razón, como primer enfoque en el escalado de la reacción, se optó por llevar a cabo ensayos a escala de matraz, con la expectativa de mejorar la aireación. El empleo de matraces con agitación orbital ofrece ventajas notables para las reacciones que dependen del oxígeno disuelto en el medio de reacción, como la aquí estudiada, al garantizar una distribución homogénea del oxígeno a lo largo del volumen del matraz. Este método también favorece la disponibilidad uniforme del sustrato, lo que es crucial para mantener la eficiencia y reproducibilidad del proceso (72). De este modo, se espera que la mejora en la aireación y la distribución del sustrato glucosa impacte positivamente en el rendimiento de la reacción (72).

El ensayo se realizó con las mejores condiciones de producción establecidas en el apartado anterior. Estas fueron 50 g/L de glucosa inicial a 30°C, utilizando 2 g/L de células en reposo de GCHM43 colectadas en la fase de crecimiento denominada F2. En esta oportunidad, el volumen de reacción fue 30 mL, y el matraz utilizado fue de un volumen total de 250 mL. Por su parte, la agitación de tipo orbital fue de 200 rpm. Nuevamente, se tomaron muestras a lo largo de 24 h para dilucidar la cinética de consumo de sustrato y formación de productos. Los resultados se observan en la Figura 25.

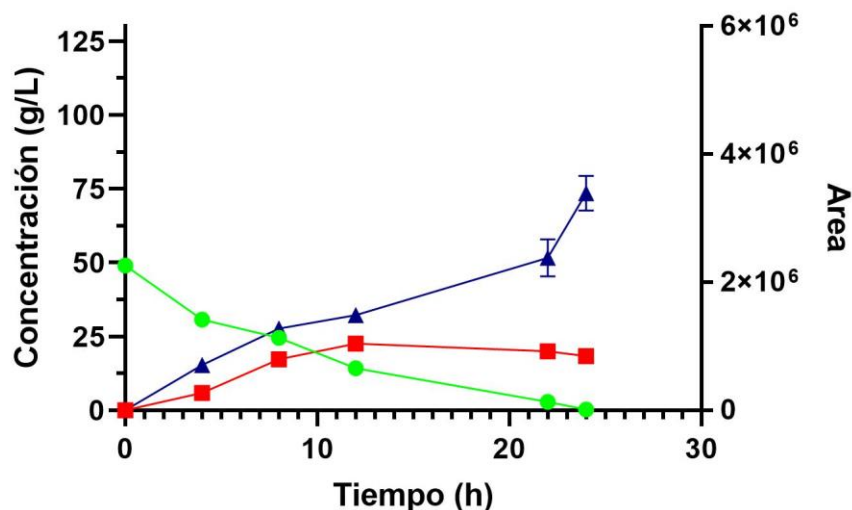


Figura 25. Análisis de la conversión de glucosa a AGlu y C9,6 por células en reposo de GCHM43 en matraces de 250 mL incubados a 30°C, a lo largo del tiempo. El medio de reacción fue 50 g/L de glucosa. La línea negra, representa la mayor concentración de Glucosa (Verde, g/L). AGlu (Rojo, g/L). C9,6 (Azul, Área).

Los resultados obtenidos en la Figura 25, permitieron determinar que se logró escalar el proceso exitosamente sin tener pérdidas significativas de productividad, presentando cinéticas similares de consumo de sustrato y formación de producto entre escalas. La productividad de AGlu alcanzada en el punto de concentración máxima de este compuesto (12 h) fue de $1,9 \pm 0,2$ g/L.h. Comparativamente, a escala de placas se había obtenido una productividad de $2,5 \pm 0,2$ g/L.h, a las 8 h. Pareciera haber diferencias en cuanto a la productividad, pero sin embargo, al calcular la productividad a 8 h de este ensayo, $2,2 \pm 0,3$ g/L.h, valor que se acerca al obtenido en placas.

En términos de concentración, la máxima obtenida para AGlu fue de $22,7 \pm 1,8$ g/L. Para ese momento, se había consumido el $71,5 \pm 0,5$ % del sustrato, aunque en las 24 h analizadas de la reacción el consumo fue cercano al 100%. Nuevamente se observa la formación de una meseta en la concentración de este producto, con una tendencia a disminuir luego de las 20 h de reacción. La formación de C9,6 por su parte se mantiene durante toda la reacción, alcanzando un área de 3392195 ± 268651 . Estos resultados, son similares a lo obtenido en placa (2925190 ± 10521).

En general, tanto a escala de matraces como a escala de placas, las concentraciones de AGlu máximas no superaron los 25 g/L debido a su posterior conversión a C9,6. Estos valores son comparativamente más bajos que los observados para los otros reportes de producción de AGlu que se presentaron anteriormente en la Tabla 1. Sin embargo, en un reporte reciente de Dai et

al, se reporta una estrategia para evitar la sobreoxidación de la glucosa, permitiendo obtener mayores concentraciones de AGlu, sin la acumulación de sus productos de oxidación [31]. Según los autores, llevar a cabo la reacción de conversión a pHs bajos de entre 2,5 y 3,5 impide el consumo del AGlu una vez formado. Con esta estrategia, se reportó una producción de 98,8 g/L de AGlu a partir de 100 g/L de glucosa utilizando la cepa *G. oxydans* 621H como catalizador. A pesar de que se trata de especies distintas, es posible que de esta forma se pueda mejorar la producción de AGlu por GCHM43. Asimismo, aunque aún no identificado, el compuesto C9,6 probablemente constituya un ketoácido con un alto valor agregado, por lo que su producción a partir de glucosa sería igualmente interesante.

Como reflexión final sobre esta etapa preliminar de ensayos de conversión de glucosa, se puede decir en términos generales que la bacteria GCHM43 constituye un biocatalizador con alto potencial para su utilización en la biotransformación de glucosa. Su capacidad de ser utilizada en reposo y de oxidar la glucosa a productos de valor agregado, aún a temperaturas que superan su óptimo, la perfilan como un biocatalizador ideal para el ámbito industrial. Los resultados prometedores obtenidos durante esta etapa sientan las bases para estudios futuros hacia la biotransformación de glucosa a mayores escalas. Esto permitirá evaluar de manera más precisa la aplicabilidad industrial del proceso y las condiciones necesarias para su escalado eficiente.

4.3.2. Biotransformaciones de glicerol

Como se ha destacado a lo largo de la introducción de esta Tesis, el glicerol representa un desafío considerable a nivel industrial debido a su abundante generación como residuo en la producción de biodiésel. En respuesta a este problema, se han explorado diversas estrategias para su valorización, entre las cuales sobresale la biotransformación empleando bacterias del género *Gluconobacter*. Particularmente, la cepa GCHM43 ya ha sido reportada en la conversión de glicerol hacia los productos de valor agregado DHA y GA. No obstante, el potencial y la capacidad de las células en reposo de GCHM43 para la conversión de este sustrato aún no han sido investigados, lo que surge como motivación para llevar adelante esta sección del trabajo.

El diseño de los ensayos fue similar al utilizado previamente para el estudio de las conversiones de glucosa, manteniendo las mismas condiciones y metodología de trabajo. Repetir estos ensayos con el nuevo sustrato en estudio está justificado, ya que las condiciones favorables para la producción máxima de AGlu determinadas anteriormente podrían no ser las más adecuadas

para obtener los productos de oxidación del glicerol, como DHA y GA. De hecho, como se mencionó en la introducción de este trabajo, las enzimas involucradas en la oxidación del glicerol hacia los productos de interés son distintas a las implicadas en la oxidación de glucosa. En ese entendido, a pesar de que la oxidación de glucosa y glicerol son ambas llevadas a cabo en el espacio periplásmico de GCHM43, tanto los sustratos, como los biocatalizadores y los productos obtenidos son diferentes. Esto podría requerir ajustes específicos en las condiciones de reacción para maximizar la eficiencia y selectividad hacia los productos deseados.

Nuevamente, es importante señalar que los ensayos que se presentarán a continuación representan una primera fase de la investigación. Por lo tanto, siguiendo el mismo enfoque que se aplicó en los estudios de oxidación de glucosa detallados anteriormente, en esta etapa se utilizó glicerol puro como sustrato para evaluar los efectos de los diferentes parámetros. Este enfoque permite identificar las condiciones más adecuadas para la biotransformación, que posteriormente podrán ser aplicadas en estudios con glicerol crudo.

4.3.2.1. Estudio del efecto de la fase de crecimiento en el que se colectan las células en la biotransformación de glicerol

Como se indicó anteriormente, la fase de crecimiento en la que se colectan las bacterias para ser utilizadas como células en reposo puede influir significativamente en su eficiencia de conversión. En otras palabras, la fase de crecimiento en la que se encuentran las bacterias al llevar a cabo la conversión es un factor crucial que afecta el resultado final de la reacción. De hecho, este fue el caso para la oxidación de glucosa descrita en el apartado anterior, donde se obtuvieron resultados variables de formación de producto y consumo de sustrato al variar este parámetro.

Este ensayo se llevó a cabo bajo las mismas condiciones utilizadas para la biotransformación de glucosa. Se obtuvieron pellets bacterianos correspondientes a tres fases distintas del crecimiento, a partir de un cultivo llevado a cabo a 30°C. Durante el ensayo, se utilizaron células en tres etapas diferentes: mitad de la fase exponencial (F1, $DO_{600nm} = 1,8$), fase exponencial tardía (F2, $DO_{600nm} = 3,0$) y fase estacionaria (FE, $DO_{600nm} = 3,5$). El tiempo de reacción se estableció en 24 horas. Nuevamente, las conversiones se llevaron a cabo inicialmente con 1 g/L de células, 50 g/L de sustrato inicial, a 30°C y 37°C, por 24 h. Al finalizar la reacción se analizó el sobrenadante para evaluar la presencia de los compuestos de interés.

En este caso, para la detección de compuestos producidos por la oxidación de glicerol no se debió poner a punto una metodología de análisis, debido a que ya se contaba con una desarrollada previamente por el grupo de investigación.

En primer lugar, se analizaron los cromatogramas obtenidos a partir de las muestras para verificar la presencia de los picos esperados. A modo de ejemplo, se muestran los cromatogramas correspondientes a los tiempos inicial y final de la conversión llevada a cabo con bacterias colectadas en la fase F2 del crecimiento (Figura 26). En el cromatograma del tiempo inicial, solo se detectó el pico correspondiente al glicerol, con un tiempo de retención (Tret) de 14,6 min. Sin embargo, después de 24 h, se observó el pico correspondiente a DHA, con un Tret de 13,4 min, junto con el pico de GA, que presentó un Tret de 11,7 min.

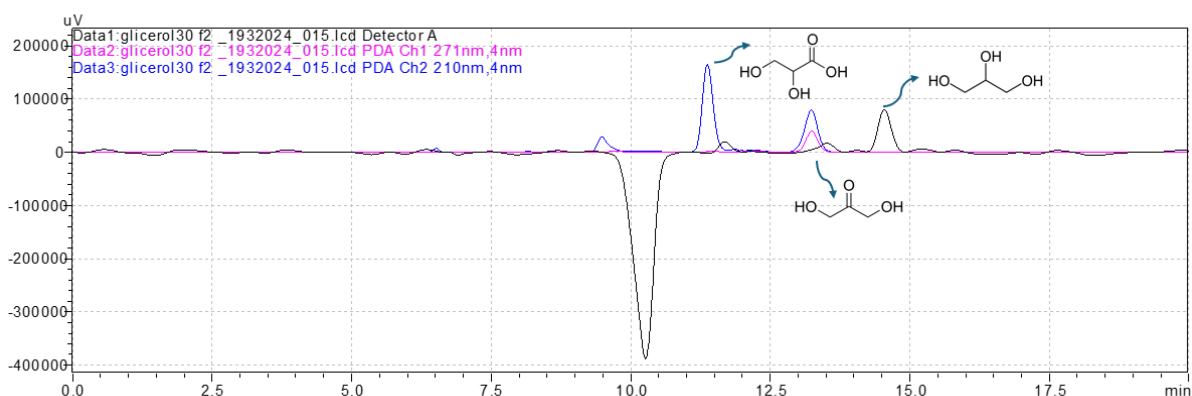


Figura 26. Conversión con GCHM43, utilizando como sustrato glicerol 50 g/L y 1 g/L de bacteria (colectadas en F2), incubado a 30°C. Tiempo inicial (negro, detector RID). Tiempo final (rosa, detector PDA, 271 nm y azul, detector PDA, 210 nm). GA (Tret=11,7 min), DHA (Tret= 13,4 min) y glicerol (Tret= 14,6 min).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se identificaron claramente los picos correspondientes a cada uno de los compuestos esperados durante la conversión con GCHM43. Una vez comprobado esto, se procedió a analizar a nivel cuantitativo los resultados obtenidos en la conversión, lo que se muestra en la Figura 27.

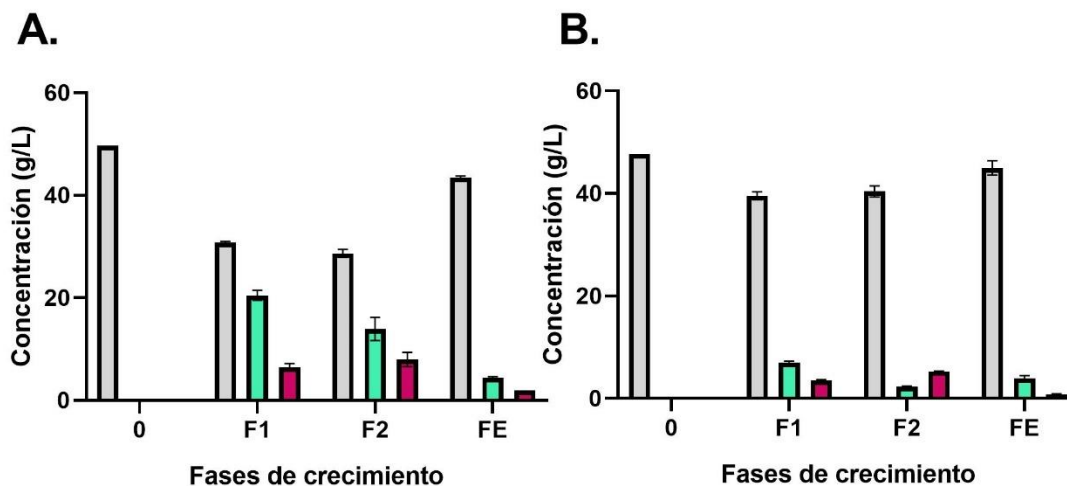


Figura 27. Análisis del efecto de utilizar células en reposo de GCHM43 colectadas en diferentes fases de crecimiento en la conversión de glicerol a DHA y GA luego de 24 h, en reacciones incubadas a diferentes temperaturas. **(A)** 30°C. **(B)** 37°C. F1 (Mitad de fase exponencial. F2 (Fase exponencial tardía). FE (Fase estacionaria). Glicerol (Gris). DHA (Celeste). GA (Violeta).

En general, se observó que las bacterias colectadas en FE mostraron los resultados más bajos tanto en la conversión de los productos de interés como en el consumo del sustrato. Como se discutió anteriormente en el punto 4.3.1.2, las células en esta fase tienden a utilizar los sustratos para sostener los procesos del metabolismo central, en lugar de favorecer los procesos de fermentación oxidativa. En contraste, las bacterias en F2 y F1 favorecen el uso de los sustratos para llevar a cabo la fermentación oxidativa, por lo que es lógico que las enzimas deshidrogenasas están más activas en estas fases. En las células en FE, este cambio de metabolismo puede generar que las enzimas no se expresen de la misma manera, o que la cantidad de enzimas activas sea menor en comparación con las bacterias colectadas en la fase exponencial.

Con respecto a las reacciones llevadas a cabo a 30 °C, en cuanto a la producción de DHA, se obtuvieron $20,5 \pm 1,0$ g/L en la conversión con células colectadas en F1, mientras que se obtuvieron $13,9 \pm 2,3$ g/L con aquellas colectadas en F2. Por otro lado, con las células colectadas en FE se obtuvo la menor conversión de únicamente $4,4 \pm 0,2$ g/L. En cuanto a la conversión a GA, con células colectadas en F1 y F2 se obtuvo $6,5 \pm 0,7$ g/L y $8,0 \pm 1,4$ g/L, respectivamente. Nuevamente, para las células colectadas en FE los resultados fueron más bajos, obteniéndose $2,0 \pm 0,1$ g/L.

Por otro lado, en las reacciones llevadas a cabo a 37°C se obtuvo $6,9 \pm 0,3$ g/L de DHA y $3,5 \pm 0,1$ g/L de GA para la conversión con células colectadas en F1, mientras que para aquellas colectadas en F2 se obtuvo $5,3 \pm 0,1$ g/L de DHA y $2,3 \pm 0,1$ g/L de GA. Para la conversión realizada con FE, se obtuvo $3,9 \pm 0,5$ g/L de DHA y $0,8 \pm 0,2$ g/L de GA.

Los resultados anteriores revelan una diferencia notable, no solo en la capacidad de conversión de las células colectadas en las distintas fases del crecimiento, sino también en la eficiencia de la conversión a las distintas temperaturas ensayadas. Al igual que en el caso de la conversión de glucosa, la producción a 37°C se ve claramente afectada, lo que posiblemente se deba a que las enzimas responsables de la conversión no están operando a su temperatura óptima. Esta conclusión se refuerza al observar las diferencias en el consumo de sustrato entre los ensayos.

En base a lo discutido, se decidió continuar los ensayos posteriores utilizando las bacterias colectadas en fase F2. Esta elección se fundamenta en la misma razón expuesta en los ensayos de conversión de glucosa: al cultivar las células hasta F2, se obtiene un mayor rendimiento de biomasa por litro de cultivo en comparación con el crecimiento hasta F1. Asimismo, las conversiones obtenidas con células colectadas en ambas fases fueron comparables para los dos compuestos, especialmente en el caso de GA. Trabajando en estas condiciones es posible obtener más biocatalizador durante el crecimiento, sin comprometer notablemente la productividad.

4.3.2.2. Estudio del efecto de la concentración de células en la biotransformación de glicerol

Como se mencionó anteriormente, el uso de distintas concentraciones de bacteria utilizada por reacción puede tener incidencia en cuanto al consumo de sustrato y la obtención de productos. De hecho, este efecto fue comprobado durante los experimentos llevados a cabo con el sustrato glucosa. Por lo tanto, el estudio de este factor en las conversiones de glicerol es necesario para la determinación de las mejores condiciones para la conversión.

Se probaron tres concentraciones, análogamente a como se realizó en el ensayo con glucosa (1 g/L, 2 g/L y 10 g/L). Nuevamente, las reacciones fueron llevadas a cabo a 30 y 37°C (Figura 28).

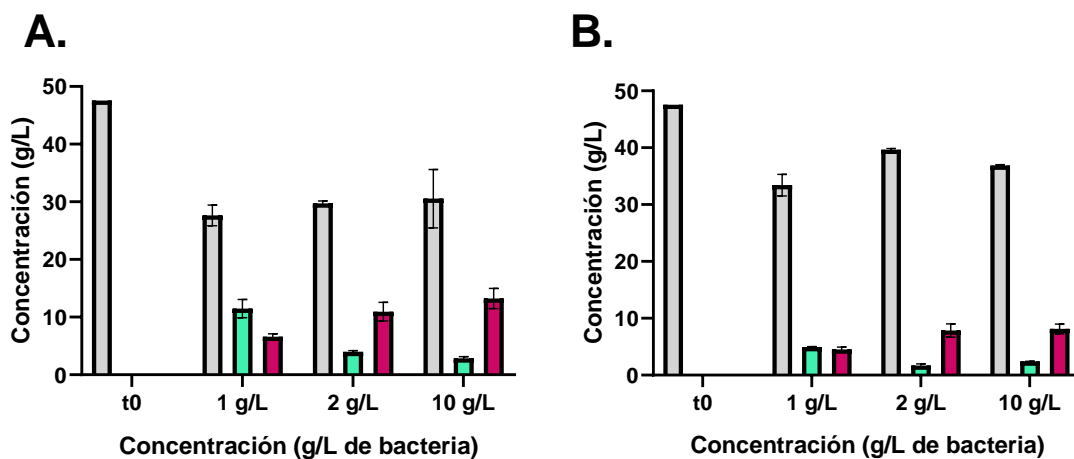


Figura 28. Análisis de conversión de glicerol a DHA y GA en 24 h en placas incubadas a 30°C (A) y a 37°C (B) para estudiar el efecto de utilizar diferentes concentraciones de GCHM4. Glicerol (Gris), DHA (Celeste) y GA (Violeta).

Con los resultados observados en la Figura 28, es posible visualizar como la concentración de bacterias influye sensiblemente en la conversión a los productos de interés a ambas temperaturas estudiadas. Interesantemente, se observó una tendencia diferencial en la oxidación del glicerol que varía según la concentración de células: a mayores concentraciones, se favorece la producción de GA, mientras que a menores concentraciones, predomina la formación de DHA.

En las reacciones llevadas a cabo a 30°C, al utilizar 1 g/L de bacteria en la reacción, se observó que se favorece la producción de DHA ($11,5 \pm 1,6$ g/L) por sobre GA ($6,6 \pm 0,5$ g/L). Sin embargo, a mayores concentraciones de bacteria inicial, se observó que se favorece la producción de GA por sobre DHA. Puntualmente, con concentraciones de 2 g/L, se obtuvieron $4,0 \pm 0,2$ g/L de DHA y $10,9 \pm 1,6$ g/L de GA, mientras que con 10 g/L de bacteria, los resultados fueron $2,9 \pm 0,3$ g/L de DHA y $13,2 \pm 1,8$ g/L de GA.

Como se mencionó anteriormente, a 37°C se repite el mismo patrón observado a 30°C, donde mayores concentraciones iniciales de bacterias favorecen la conversión a GA. Sin embargo las concentraciones finales alcanzadas de los productos son menores. Con 1 g/L de bacterias en la reacción, se obtuvieron $4,9 \pm 0,1$ g/L de DHA y $4,5 \pm 0,4$ g/L de GA. Al aumentar la concentración a 2 g/L de bacterias, se produjo $1,7 \pm 0,3$ g/L de DHA y $7,8 \pm 1,2$ g/L de GA.

Finalmente, con 10 g/L de bacterias, se alcanzaron $2,3 \pm 0,1$ g/L de DHA y $8,1 \pm 0,9$ g/L de GA.

Considerando el alto valor de mercado que presenta el GA frente al de la DHA, desde el punto de vista económico, resulta más interesante llevar a cabo las reacciones en condiciones en las que se favorezca la formación de GA. Según lo observado, a las concentraciones de 2 g/L y 10 g/L se observa este patrón. Dado que tanto el consumo de sustrato como la producción de los compuestos de oxidación fueron muy similares en estas dos condiciones, el uso de 10 g/L de bacteria no se ve justificado. Llevar a cabo la reacción de conversión en estas condiciones a nivel industrial requeriría de grandes cantidades de bacterias, lo que supondría un mayor costo económico. Por estas razones, se decidió continuar los ensayos posteriores con una concentración de 2 g/L de bacteria.

4.3.2.3. Estudio del efecto de la concentración inicial de sustrato en la biotransformación de glicerol

La concentración de glicerol presente en el medio de reacción juega un papel fundamental en cuanto a la eficiencia de conversión a producto. Ha sido reportado que altas concentraciones de glicerol pueden generar un efecto de inhibición por sustrato para las bacterias del género *Gluconobacter* ([43]). Por lo tanto, al realizar biotransformaciones con este tipo de bacterias, es esencial evaluar diversas concentraciones de glicerol para identificar y corroborar la aparición de este efecto inhibitorio. Adicionalmente, cabe mencionar que la DHA ha mostrado evidencias de causar inhibición por producto [43]. En cuanto al GA, no existen aún reportes de si posee efectos inhibitorios en la conversión de glicerol. Por este motivo, es relevante llevar a cabo ensayos de cinética de producción para identificar posibles efectos indeseables asociados con la acumulación de estos compuestos.

En consecuencia, en este ensayo se decidió corroborar cómo influye la concentración inicial de glicerol en la cinética de conversión a los productos de interés. Para ello, se procedió a realizar conversiones con células en reposo (2 g/L), variando la concentración de sustrato inicial (15 g/L, 50 g/L, 70 g/L y 120 g/L) durante 24 h. Cada concentración, se probó tanto para 30°C (Figura 29) como para 37°C (Figura 30).

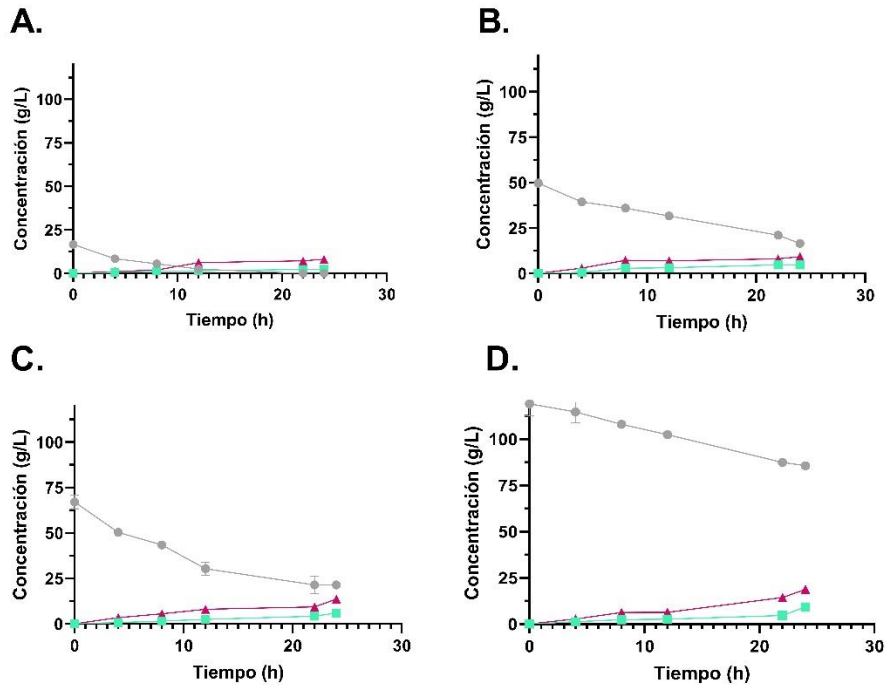


Figura 29. Análisis del efecto de utilizar distintas concentraciones iniciales de sustrato en la conversión de glicerol a DHA y GA por células en reposo de GCHM43 a 30 °C. (A) 15 g/L. (B) 50 g/L. (C) 70 g/L. (D) 120 g/L. Glicerol (Gris), GA (Violeta) y DHA (Celeste).

En los ensayos llevados a cabo a 30°C, se observó de forma marcada que un aumento en la concentración de sustrato se ve acompañada de una mayor formación de los productos de interés. A la concentración más baja de sustrato (15 g/L), se obtuvo una concentración de $2,42 \pm 0,4$ g/L de DHA y $8,2 \pm 0,3$ g/L de GA. Solo en estas condiciones se logró observar el consumo total del sustrato durante la duración de la reacción de conversión. A concentraciones medias de glicerol, se obtuvieron los siguientes resultados: a 50 g/L, se produjeron $4,7 \pm 0,1$ g/L de DHA y $9,3 \pm 0,3$ g/L de GA, mientras que a 70 g/L, se obtuvieron $5,9 \pm 1,5$ g/L de DHA y $13,6 \pm 2,2$ g/L de GA. Finalmente a la concentración más alta de sustrato inicial (120 g/L), se logró obtener $9,2 \pm 0,7$ g/L de DHA y $18,7 \pm 0,6$ g/L de GA.

Como se observó anteriormente, en el lapso estudiado, a las concentraciones mayores de 50 g/L de glicerol no se obtuvieron conversiones totales de sustrato. Sin embargo, observando las tendencias de las curvas de formación de producto y consumo de sustrato, es posible que el tiempo de reacción haya sido insuficiente. En base a lo observado en estas primeras 24 horas de reacción para las condiciones ensayadas no parecen ser evidentes efectos de inhibición por producto o por sustrato.

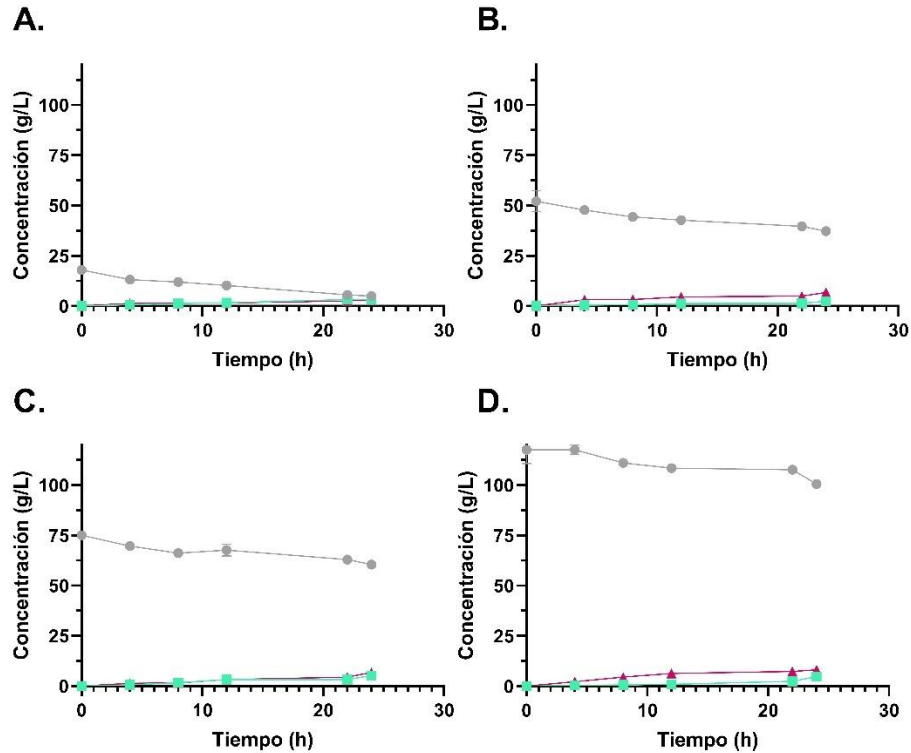


Figura 30. Análisis del efecto de utilizar distintas concentraciones iniciales de sustrato en la conversión de glicerol a DHA y GA por células en reposo de GCHM43 a 37 °C. (A) 15 g/L. (B) 50 g/L. (C) 70 g/L. (D) 120 g/L. Glicerol (Gris), GA (Violeta) y DHA (Celeste).

Por otro lado, los resultados de conversión obtenidos a 37°C fueron inferiores a los observados a 30°C, mostrando concentraciones más bajas de los productos de interés en todas las condiciones evaluadas. Nuevamente, se observó una tendencia general a una mayor producción de los compuestos de interés con el aumento de la concentración inicial de sustrato.

En los ensayos realizados a 37°C, a la concentración más baja de sustrato (15 g/L), se obtuvieron $3,2 \pm 0,4$ g/L de DHA y $3,3 \pm 0,3$ g/L de GA, con una conversión casi completa del sustrato. A concentraciones medias de glicerol, los resultados fueron los siguientes: a 50 g/L se produjeron $2,1 \pm 0,5$ g/L de DHA y $4,7 \pm 0,2$ g/L de GA, mientras que a 70 g/L se obtuvieron $5,3 \pm 0,3$ g/L de DHA y $6,7 \pm 0,3$ g/L de GA. Finalmente, a la concentración más alta de sustrato (120 g/L), se obtuvieron $4,7 \pm 0,2$ g/L de DHA y $8,1 \pm 0,2$ g/L de GA.

Dado que en este trabajo se decidió priorizar la formación del GA frente a la de DHA, se realizó una comparación entre todos los ensayos realizados durante esta etapa para establecer cuáles fueron las mejores condiciones para la obtención de este compuesto (Tabla 9).

Tabla 9. Máximas producciones de GA por ensayo, para la determinación de las mejores condiciones.

Temperatura (°C)	Conc. de sustrato inicial (g/L)	Conc. máxima de producto (g/L)	Tiempo para conc. máxima de producto (g/L)	Productividad (g/L. h)	% Conversión de sustrato
30	15	8,2 ± 0,3	24	0,34 ± 0,02	100
30	50	9,3 ± 0,3	24	0,39 ± 0,01	67,0 ± 1,3
30	70	13,6 ± 2,1	24	0,58 ± 0,09	69,2 ± 0,5
30	120	18,7 ± 0,6	24	0,78 ± 0,02	28,6 ± 0,3
37	15	3,2 ± 0,3	24	0,14 ± 0,02	66,8 ± 0,1
37	50	6,7 ± 0,2	24	0,28 ± 0,06	25,6 ± 0,1
37	70	6,8 ± 0,3	24	0,26 ± 0,01	13,6 ± 0,4
37	120	8,1 ± 0,2	24	0,34 ± 0,02	16,2 ± 0,1

Los valores más altos de productividad de GA registrados fueron $0,6 \pm 0,03$ g/Lh y $0,8 \pm 0,04$ g/Lh, correspondientes a las conversiones realizadas con 70 y 120 g/L de glicerol a 30°C, respectivamente. Sin embargo, al analizar los porcentajes de conversión de sustrato, se observó que con 70 g/L de glicerol se alcanzó un mayor consumo de sustrato ($69,2 \pm 0,5\%$) en comparación con 120 g/L ($28,6 \pm 0,3\%$). En base a estos resultados, resulta eficiente trabajar con 70 g/L de sustrato, ya que no solo se obtiene una productividad alta, sino también un aprovechamiento más efectivo del sustrato, lo cual es beneficioso desde un punto de vista económico y operacional. Por las razones antes mencionadas, se seleccionaron estas condiciones experimentales para el ensayo siguiente. El mismo, en una aproximación análoga a la llevada a cabo en los estudios de conversión de glucosa, consistió en una primera aproximación al escalado de esta reacción a escala de matraz.

4.3.1.5. Biotransformación de glicerol a escala de matraces

Considerando el éxito obtenido en las pruebas preliminares de biotransformación de glicerol en placas de 24 pocillos, se decidió avanzar hacia ensayos en condiciones más representativas de un entorno industrial. El siguiente paso clave en esta evaluación fue la ejecución de experimentos a escala de matraz, lo cual marca una transición crucial en el proceso de escalado. Tal como se discutió previamente, el uso de matraces puede ofrecer ventajas operativas significativas, especialmente en términos de aireación. Esta mejora en la distribución de oxígeno podría traducirse en un aumento de la productividad en comparación con los ensayos realizados en placas.

En estos ensayos, se utilizaron las condiciones en las que se obtuvo mejores rendimientos del compuesto GA. Estas fueron 70 g/L de glicerol inicial, a 30°C, con 2 g/L de células en reposo de GCHM43 recolectadas en la fase F2. El volumen de reacción fue de 30 mL en un matraz de 250 mL, agitado a 200 rpm. Este diseño experimental permitió una mejor evaluación de la cinética de la reacción y el rendimiento de productos en un entorno más representativo de escalas mayores. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 31.

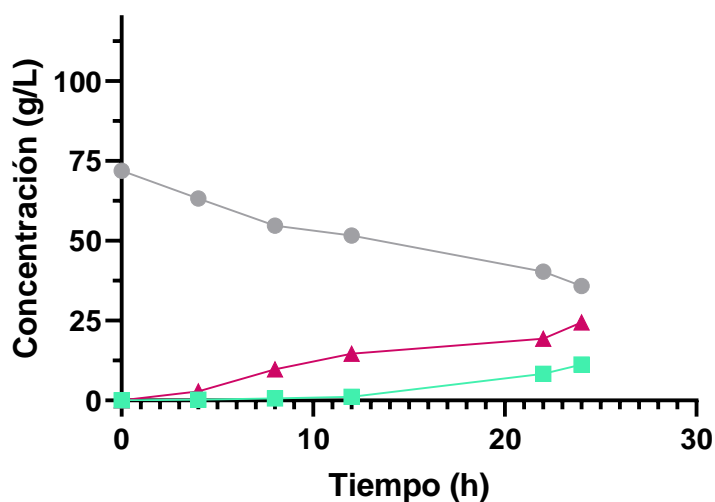


Figura 31. Análisis de conversión de glicerol a DHA y GA en matraces incubados a 30°C, a lo largo del tiempo. El medio de reacción fue 70 g/L de glicerol. Glicerol (Gris), GA (Violeta) y DHA (Celeste).

En las nuevas condiciones ensayadas, la conversión de glicerol a GA generó $24,4 \pm 0,3$ g/L, con una acumulación de $11,2 \pm 0,1$ g/L de DHA. Al comparar los resultados entre los

experimentos llevados a cabo en distintas escalas, se observó que a escala de matraz se incrementó la producción de ambos compuestos, manteniéndose la tendencia a favorecer la generación de GA. La productividad obtenida para este producto fue de $1,0 \pm 0,1$ g/Lh, lo que representa una mejora notable respecto a los valores previos ($0,6 \pm 0,03$ g/Lh).

El incremento en la aireación parece ser un factor clave en la mejora de la producción. Una posible explicación es que, en los ensayos en placas, la viscosidad del medio podría haber afectado negativamente la disponibilidad de oxígeno para las bacterias. En los matraces, la mayor superficie para el intercambio de gases contribuye a mantener una mezcla más homogénea, facilitando la absorción de oxígeno disuelto en el medio.

En cuanto al sustrato, se consumió un $51,3 \pm 0,8$ %, dejando aproximadamente 35 g/L de glicerol remanente. Esta cantidad podría reducirse extendiendo el tiempo de reacción, lo que en consecuencia también podría aumentar la concentración de productos.

Los resultados obtenidos son prometedores para futuras etapas de escalado. Además, abren la posibilidad de explorar la reacción utilizando glicerol crudo, un subproducto de la industria del biodiesel, que podría tener un gran interés industrial para su aprovechamiento.

En términos generales, los ensayos de biotransformación de glicerol utilizando células en reposo de GCHM43 llevados a cabo durante esta etapa del trabajo, demostraron que esta cepa es un biocatalizador con gran potencial para la conversión de glicerol a productos de valor agregado. Se observa una mejora significativa en la conversión de glicerol a GA en matraces en comparación con estudios previos. En un estudio reportado por Habe et al., con la cepa GCHM43, se obtuvo una concentración de $18,8 \pm 0,3$ g/L de GA después de 4 días de incubación. Sin embargo, en el presente trabajo, se alcanzó una concentración de $24,4 \pm 0,3$ g/L en solo 24 horas, lo que demuestra una mayor eficiencia en las condiciones experimentales actuales (16).

La capacidad de la cepa para mantener su actividad catalítica incluso al escalar el proceso a matraces, sumada a la mejora en la productividad observada bajo condiciones de mayor aireación, refuerzan la viabilidad de este enfoque para aplicaciones industriales. Los resultados aquí obtenidos sientan las bases para continuar con el estudio del proceso de biotransformación

de glicerol, con miras a su implementación en entornos industriales reales, incluyendo la posibilidad de utilizar glicerol crudo como sustrato alternativo.

5. Análisis económico

Dado que los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis representan las etapas preliminares de la investigación, no resulta pertinente realizar un análisis económico en esta etapa.

6. Conclusiones

Durante esta Tesis de grado, se buscó explorar la capacidad de oxidación de glucosa y glicerol por células en reposo de la cepa termotolerante GCHM43. La importancia de oxidar estos sustratos radica en que ambos son de relevancia industrial, ya que son componentes los principales de residuos de la industria agrícola-forestal, para el caso de la glucosa y de la producción de biodiésel, para el caso del glicerol. A partir de estos sustratos se puede obtener productos de valor agregado, como el AGlu, la DHA y el GA.

La cepa GCHM43 fue adquirida por el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad en el contexto de esta Tesis. Por este motivo, una vez reconstituida, se realizaron una serie de ensayos de caracterización que sirvieron de control para confirmar su identidad. Los resultados obtenidos en la caracterización fueron cotejados con lo descrito por Moongmangmee et al (17), quienes reportaron la cepa por primera vez, obteniendo los resultados esperados. Asimismo, se diseñó exitosamente una PCR para la amplificación de una sección del gen del ARNr 16s de GCHM43, cuyos resultados fueron complementarios a los estudios de caracterización mencionados anteriormente.

Se logró crecer la cepa a distintas temperaturas, comprobando su capacidad termotolerante al observarse crecimiento a 37°C. Sin embargo, los mejores resultados en términos de rendimiento de biomasa y velocidad de crecimiento fueron observados a 30°C. La construcción de las curvas de crecimiento permitió además determinar las diferentes fases del crecimiento bacteriano y su duración en las condiciones del ensayo. Adicionalmente, mediante la generación de una curva de peso seco, se obtuvo de manera exitosa una correlación entre la DO_{600nm} y la concentración bacteriana en los cultivos. Estos dos últimos resultados fueron fundamentales para el diseño de los ensayos posteriores utilizando células en reposo.

Antes de iniciar con el estudio de las conversiones, fue necesario establecer un método de análisis por HPLC para la detección y cuantificación de glucosa y su producto de oxidación, AGlu. Esto se debió a que, hasta el presente trabajo de Tesis, el Laboratorio de la Universidad no contaba con un método de análisis para estos compuestos. Se logró determinar que una de las metodologías ya implementadas por el grupo de investigación era adecuada para llevar a cabo este análisis. A través de la misma, se pudo obtener exitosamente las curvas de calibración

necesarias para garantizar la precisión y exactitud en la medición de las concentraciones de glucosa y AGlu en las muestras.

En cuanto a los ensayos de conversión, se comenzó con la biotransformación de glucosa y glicerol puros, en placas de 24 pocillos. En estos experimentos, se estudiaron varios parámetros clave, como la temperatura de incubación, la fase de crecimiento en el que se colectaron las células en reposo, la concentración de células en la reacción y la concentración de sustrato inicial. El objetivo fue determinar las condiciones más favorables para llevar a cabo las distintas biotransformaciones, utilizando una metodología sencilla que permitiera evaluar múltiples condiciones simultáneamente y garantizar un tratamiento uniforme de los experimentos.

Los resultados obtenidos tanto para la oxidación de glucosa como para la de glicerol confirmaron que GCHM43 puede ser utilizada exitosamente como catalizador en reposo para la obtención de los productos de interés. En el caso de la glucosa, la cepa produce AGlu y un compuesto aún no identificado denominado C9,6, que se presume es un producto de la oxidación del AGlu. Por otro lado, en la biotransformación del glicerol, las células en reposo de GCHM43 demuestran la capacidad de generar tanto DHA como GA.

Se identificaron las condiciones más favorables para la conversión a los productos de interés. En el caso de la glucosa, los mejores resultados se obtuvieron utilizando bacterias colectadas en fase exponencial tardía (F2), con una concentración bacteriana de 2 g/L y 50 g/L de glucosa inicial a 30°C. Esta configuración permitió alcanzar la mayor concentración de AGlu ($20,4 \pm 2,1$ g/L).

En cuanto al glicerol, se encontró que las condiciones óptimas incluían el uso de bacterias en fase F2, con una concentración celular de 2 g/L y 70 g/L de glicerol inicial a 30°C. Este conjunto de condiciones maximizó la producción de GA ($13,6 \pm 2,1$ g/L para la mejor condición), el compuesto de oxidación del glicerol más prometedor desde el punto de vista económico.

Posteriormente, ambos procesos se escalaron exitosamente a matraces agitados, sin observar pérdidas en la productividad. En la biotransformación de glucosa, se mantuvo una conversión similar a la obtenida en placas, obteniendo una concentración máxima de AGlu de $22,7 \pm 1,8$ g/L. Por su parte, la biotransformación del glicerol mejoró notablemente, obteniendo concentraciones de GA de $24,4 \pm 0,3$ g/L y de DHA de $22,7 \pm 1,8$ g/L.

A pesar de que en general los ensayos de conversión realizados a 30°C presentaron mejores resultados, los ensayos llevados a cabo a 37°C demostraron que las células en reposo de GCHM43 mantienen su capacidad de oxidación de los sustratos de interés, incluso con el aumento de la temperatura. Desde un punto de vista industrial, esto resulta beneficioso, ya que este tipo de cepas termotolerantes son menos susceptibles a las frecuentes oscilaciones de temperatura que suelen ocurrir en los procesos industriales. Esta estabilidad térmica es ventajosa desde el punto de vista económico, ya que reduce la necesidad de controles estrictos y costosos sobre las condiciones de operación, facilitando una mayor flexibilidad en el proceso y potencialmente reduciendo los costos de producción

Cabe destacar que, si bien la biotransformación de glicerol con la cepa GCHM43 había sido previamente documentada, este estudio es el primero en emplear células en reposo para dicha conversión. De hecho, los resultados obtenidos en esta Tesis superaron aquellos reportados anteriormente para la biotransformación de glicerol con células en crecimiento de esta cepa. Adicionalmente, esta investigación es la primera en explorar la oxidación de glucosa utilizando GCHM43, ya que no existen antecedentes de esta conversión, ni con células en crecimiento ni en reposo.

Estos resultados representan un avance significativo para el grupo de investigación, ya que son los primeros ensayos realizados con esta cepa en el Laboratorio. De esta forma, quedan sentadas las bases para futuros proyectos de investigación, que podrán enfocarse en la conversión de glicerol y glucosa provenientes de residuos, a mayores escalas.

En resumen, esta investigación representa un avance en la biotransformación de sustratos de relevancia industrial utilizando cepas de *Gluconobacter*. Los resultados aquí obtenidos son fundamentales para continuar investigando la potencialidad de la utilización de células termotolerantes en reposo para este tipo de biotransformaciones. El desarrollo y la aplicación de estas tecnologías contribuye al establecimiento de biorrefinerías y permite acercar a la industria a una química más verde y sostenible.

7. Referencias bibliográficas

1. Maina S, Kachrimanidou V, Koutinas A. A roadmap towards a circular and sustainable bioeconomy through waste valorization. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2017;8:18–23. doi:10.1016/J.COGSC.2017.07.007
2. Bell EL, Finnigan W, France SP, Green AP, Hayes MA, Hepworth LJ, Lovelock SL, Niikura H, Osuna S, Romero E, et al. Biocatalysis. *Nature Reviews Methods Primers*. 2021;1(1). doi:10.1038/S43586-021-00044-Z
3. Pervaiz I, Ahmad S, Madni MA, Ahmad H, Khaliq FH. Microbial biotransformation: a tool for drug designing (Review). *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*. 2013;49(5):435–449. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25474866/>. doi:10.7868/S0555109913050097
4. Leresche JE, Meyer HP. Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): Some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. *Organic Process Research and Development*. 2006 ;10(3):572–580. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/op0600308>. doi:10.1021/OP0600308/ASSET/IMAGES/MEDIUM/OP0600308N00001.GIF
5. Woodley JM. New frontiers in biocatalysis for sustainable synthesis. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2020;21:22–26. doi:10.1016/J.COGSC.2019.08.006
6. Leong HY, Chang CK, Khoo KS, Chew KW, Chia SR, Lim JW, Chang JS, Show PL. Waste biorefinery towards a sustainable circular bioeconomy: a solution to global issues. *Biotechnology for Biofuels*. 2021;14(1). doi:10.1186/s13068-021-01939-5
7. Soriano N. Producción de ácido glicérico por *Gluconobacter frateurii* NBRC103465. Universidad ORT Uruguay; 2022.
8. Grogan G. Biotransformations. *Annual Reports Section “B” (Organic Chemistry)*. 2009;105(0):206–231. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2009/oc/b822048b>. doi:10.1039/B822048B

9. De Carvalho C, Da Fonseca M. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology* ©2007 Global Science Books. Global Science Books. 2007;1.
10. Julsing MK, Kuhn D, Schmid A, Bühler B. Resting cells of recombinant *E. coli* show high epoxidation yields on energy source and high sensitivity to product inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012;109(5):1109–1119. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bit.24404>. doi:10.1002/BIT.24404
11. Guajardo N, Schrebler RA. Upstream and Downstream Bioprocessing in Enzyme Technology. *Pharmaceutics* 2024, Vol. 16, Page 38. 2023 [accessed 2024 Aug 27];16(1):38. <https://www.mdpi.com/1999-4923/16/1/38/htm>. doi:10.3390/PHARMACEUTICS16010038
12. Sengun IY, Karabiyikli S. Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*. 2011;22(5):647–656. doi:10.1016/J.FOODCONT.2010.11.008
13. Deppenmeier U, Ehrenreich A. Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 2009;16(1–2):69–80. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18957863/>. doi:10.1159/000142895
14. Matsushita K, Yakushi T, Toyama H, Adachi O, Miyoshi H, Tagami E, Sakamoto K. The quinohemoprotein alcohol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* has ubiquinol oxidation activity at a site different from the ubiquinone reduction site. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1999;1409(3):154–164. doi:10.1016/S0005-2728(98)00158-3
15. Qin Z, Yu S, Chen J, Zhou J. Dehydrogenases of acetic acid bacteria. *Biotechnology advances*.2022;54.<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34793881/>. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2021.107863
16. Habe H, Sato Y, Tani H, Matsutani M, Tanioka K, Theeragool G, Matsushita K, Yakushi T. Heterologous expression of membrane-bound alcohol dehydrogenase-encoding genes for glyceric acid production using *Gluconobacter* sp. CHM43 and its derivatives.

- Applied microbiology and biotechnology. 2021;105(18):6749–6758.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34453563/>. doi:10.1007/S00253-021-11535-0
17. Adachi O, Ano Y, Shinagawa E, Toyama H, Theeragool G, Lotong N, Matsushita K. Isolation and characterization of thermotolerant *Gluconobacter* strains catalyzing oxidative fermentation at higher temperatures. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2000;64(11):2306–2315. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11193396/>. doi:10.1271/BBB.64.2306
 18. Saichana N, Matsushita K, Adachi O, Frébort I, Frebortova J. Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. 2015;33(6):1260–1271. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2014.12.001
 19. Hattori H, Yakushi T, Matsutani M, Moonmangmee D, Toyama H, Adachi O, Matsushita K. High-temperature sorbose fermentation with thermotolerant *Gluconobacter frateurii* CHM43 and its mutant strain adapted to higher temperature. *Applied microbiology and biotechnology*. 2012;95(6):1531–1540. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22434571/>. doi:10.1007/S00253-012-4005-4
 20. Adachi O, Nguyen TM, Hours RA, Kataoka N, Matsushita K, Akakabe Y, Yakushi T. 5-Keto-D-fructose production from sugar alcohol by isolated wild strain *Gluconobacter frateurii* CHM 43. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2020;84(8):1745–1747. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32427050/>. doi:10.1080/09168451.2020.1767500
 21. Moonmangmee D, Adachi O, Shinagawa E, Toyama H, Theeragool G, Lotong N, Matsushita K. L-Erythrulose Production by Oxidative Fermentation is Catalyzed by PQQ-Containing Membrane-bound Dehydrogenase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2002;66(2):307–318. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1271/bbb.66.307>. doi:10.1271/BBB.66.307
 22. Galant AL, Kaufman RC, Wilson JD. Glucose: Detection and analysis. *Food Chemistry*. 2015;188:149–160. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2015.04.071
 23. Miranda I, Simões R, Medeiros B, Nampoothiri KM, Sukumaran RK, Rajan D, Pereira

- H, Ferreira-Dias S. Valorization of lignocellulosic residues from the olive oil industry by production of lignin, glucose and functional sugars. *Bioresource Technology*. 2019;292:121936. doi:10.1016/J.BIORTECH.2019.121936
24. Ripoll M, Betancor L. Opportunities for the valorization of industrial glycerol via biotransformations. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2021;28:100430. doi:10.1016/J.COGSC.2020.100430
 25. Cañete-Rodríguez AM, Santos-Dueñas IM, Jiménez-Hornero JE, Ehrenreich A, Liebl W, García-García I. Gluconic acid: Properties, production methods and applications—An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization. *Process Biochemistry*. 2016;51(12):1891–1903. doi:10.1016/J.PROCBIO.2016.08.028
 26. Nieto-Peñalver CG, Savino MJ, Bertini E V., Sánchez LA, de Figueroa LIC. Gluconic acid produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 possesses antimicrobial properties. *Research in Microbiology*. 2014;165(7):549–558. doi:10.1016/J.RESMIC.2014.06.003
 27. Jackson E. Bioconversiones para la revalorización de glicerol: síntesis de ácido L-láctico utilizando una cascada biosintética. Facultad de Química, Universidad de la República y PEDECIBA Química; 2015.
 28. Zhou X, Zhou X, Liu G, Xu Y, Balan V. Integrated production of gluconic acid and xyloonic acid using dilute acid pretreated corn stover by two-stage fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2018;137:18–22. doi:10.1016/J.BEJ.2018.05.005
 29. Zhang R, Li F, Liu X, Zhou X, Jiang K. Valorization of Cheese Whey Powder by Two-Step Fermentation for Gluconic Acid and Ethanol Preparation. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38158487/>. doi:10.1007/S12010-023-04834-X
 30. Zhou X, Xu Y. Integrative process for sugarcane bagasse biorefinery to co-produce xylooligosaccharides and gluconic acid. *Bioresource technology*. 2019;282:81–87. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30852335/>. doi:10.1016/J.BIORTECH.2019.02.129

31. Dai L, Lian Z, Fu Y, Zhou X, Xu Y, Zhou X, Kuznetsov BN, Jiang KK. Low pH Stress Enhances Gluconic Acid Accumulation with Enzymatic Hydrolysate as Feedstock Using *Gluconobacter oxydans*. *Fermentation* 2023, Vol. 9, Page 278. 2023;9(3):278. <https://www.mdpi.com/2311-5637/9/3/278/htm>. doi:10.3390/FERMENTATION9030278
32. Dai L, Lian Z, Zhang R, Nawaz A, ul Haq I, Zhou X, Xu Y. Multi-strategy in production of high titer gluconic acid by the fermentation of concentrated cellulosic hydrolysate with *Gluconobacter oxydans*. *Industrial Crops and Products*. 2022;189:115748. doi:10.1016/J.INDCROP.2022.115748
33. da Silva GAR, Oliveira SS de S, Lima SF, do Nascimento RP, Baptista AR de S, Fiaux SB. The industrial versatility of *Gluconobacter oxydans*: current applications and future perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2022 38:8. 2022;38(8):1–20. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-022-03310-8>. doi:10.1007/S11274-022-03310-8
34. Tan HW, Abdul Aziz AR, Aroua MK. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2013;27:118–127. doi:10.1016/J.RSER.2013.06.035
35. Valiente Torres A. Valorización de glicerina mediante reformado en fase acuosa con catalizadores basados en níquel. Universidad de Zaragoza; 2013. <http://zaguan.unizar.es>
36. Veiga S, Bussi J. Efficient Conversion of Glycerol to a H₂ Rich Gas Mixture by Steam Reforming over NiLaZr Catalysts. *Topics in Catalysis*. 2016;59(2–4):186–195. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11244-015-0444-3>. doi:10.1007/S11244-015-0444-3/METRICS
37. de la Morena S. Producción de DHA a partir de glicerol con *Gluconobacter oxydans*: desarrollo del bioproceso. Universidad Complutense de Madrid: Facultad de Ciencias; 2018.
38. Ripoll M. Biotransformaciones de glicerol por cepas inmovilizadas de *Gluconobacter*.

39. Dikshit PK, Padhi SK, Moholkar VS. Process optimization and analysis of product inhibition kinetics of crude glycerol fermentation for 1,3-Dihydroxyacetone production. *Bioresource Technology*. 2017;244:362–370. doi:10.1016/J.BIORTECH.2017.07.136
40. Jackson E, Ripoll M, Betancor L. Efficient glycerol transformation by resting *Gluconobacter* cells. *MicrobiologyOpen*. 2019;8(12):e926. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mbo3.926>. doi:10.1002/MBO3.926
41. Zheng XJ, Jin KQ, Zhang L, Wang G, Liu YP. Effects of oxygen transfer coefficient on dihydroxyacetone production from crude glycerol. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016;47(1):129–135. doi:10.1016/J.BJM.2015.11.020
42. Ripoll M, Jackson E, Trelles JA, Betancor L. Dihydroxyacetone production via heterogeneous biotransformations of crude glycerol. *Journal of Biotechnology*. 2021;340(4):102–109. doi:10.1016/j.jbiotec.2021.08.011
43. Dikshit PK, Moholkar VS. Batch and Repeated-Batch Fermentation for 1,3-Dihydroxyacetone Production from Waste Glycerol Using Free, Immobilized and Resting *Gluconobacter oxydans* Cells. *Waste and Biomass Valorization*. 2019;10(9):2455–2465. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-018-0307-9>. doi:10.1007/S12649-018-0307-9/METRICS
44. Ciriminna R, Fidalgo A, Ilharco LM, Pagliaro M. Dihydroxyacetone: An Updated Insight into an Important Bioproduct. *ChemistryOpen*. 2018;7(3):233–236. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29531886/>. doi:10.1002/OPEN.201700201
45. Habe H, Shimada Y, Fukuoka T, Kitamoto D, Itagaki M, Watanabe K, Yanagishita H, Yakushi T, Matsushita K, Sakaki K. Use of a *Gluconobacter frateurii* Mutant to Prevent Dihydroxyacetone Accumulation during Glyceric Acid Production from Glycerol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2010;74(11):2330–2332. <https://dx.doi.org/10.1271/bbb.100406>. doi:10.1271/BBB.100406

46. Sato S. Application of Glyceric Acid to Bio-related Functional Materials and Improvement of Microbial Production. *Journal of oleo science*. 2021;70(3):289–295. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33583924/>. doi:10.5650/JOS.ESS20307
47. Khanna S, Goyal A, Moholkar VS. Microbial conversion of glycerol: Present status and future prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2012;32(3):235–262. doi:10.3109/07388551.2011.604839
48. Zhu K, Lu L, Wei L, Wei D, Imanaka T, Hua Q. Modification and evolution of *Gluconobacter oxydans* for enhanced growth and biotransformation capabilities at low glucose concentration. *Molecular biotechnology*. 2011;49(1):56–64. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21253895/>. doi:10.1007/S12033-011-9378-6
49. Ripoll M, Bravo R. Biotransformaciones para la revalorización de glicerol. Universidad ORT Uruuguay; 2017.
50. Dwivedi M. *Gluconobacter*. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi*. 2020 Jan 1:521–544. doi:10.1016/B978-0-12-823414-3.00025-3
51. Chester B. Semiquantitative catalase test as an aid in identification of oxidative and nonsaccharolytic gram-negative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 1979;10(4):525–528. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.10.4.525-528.1979>. doi:10.1128/JCM.10.4.525-528.1979
52. Beebe JL. Identification of mycobacteria. *Clinical Microbiology Newsletter*. 1981;3(10):67–69. doi:10.1016/S0196-4399(81)80056-6
53. Bolivar AM, Rojas A, Garcia Lugo P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. 2014;3(1):25–33.
54. Valenzuela-González F, Casillas-Hernández R, Villalpando E, Vargas-Albores F. El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias marinas*. 2015;41(4):297–313. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-

38802015000400297&lng=es&nrm=iso&tlng=es. doi:10.7773/CM.V4I14.2492

55. Caycedo Lozano L, Ramírez LCC, Suárez DMT, Caycedo Lozano L, Ramírez LCC, Suárez DMT. Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*.2021;19(36):49–94.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702021000100049&lng=en&nrm=iso&tlng=es. doi:10.22490/24629448.5293
56. Maier RM, Pepper IL. Bacterial Growth. *Environmental Microbiology: Third Edition*. 2015 Jan 1:37–56. doi:10.1016/B978-0-12-394626-3.00003-X
57. Li C, Ouyang Z, Liu J. Bacterial growth and cultivation. *Molecular Medical Microbiology, Third Edition*. 2023 Jan 1:155–175.
https://www.researchgate.net/publication/377522235_Bacterial_growth_and_cultivation. doi:10.1016/B978-0-12-818619-0.00070-8
58. He Y, Xie Z, Zhang H, Liebl W, Toyama H, Chen F. Oxidative Fermentation of Acetic Acid Bacteria and Its Products. *Frontiers in microbiology*. 2022;13.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35685922/>. doi:10.3389/FMICB.2022.879246
59. Krajewski V, Simić P, Mouncey NJ, Bringer S, Sahm H, Bott M. Metabolic Engineering of *Gluconobacter oxydans* for Improved Growth Rate and Growth Yield on Glucose by Elimination of Gluconate Formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010;76(13):4369. /pmc/articles/PMC2897456/. doi:10.1128/AEM.03022-09
60. Singh A, Kuhad RC, Sahai V, Ghosh P. Evaluation of biomass. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 1994;51:47–70. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8165951/>. doi:10.1007/BFB0008733
61. Al-Sanea MM, Gamal M. Critical analytical review: Rare and recent applications of refractive index detector in HPLC chromatographic drug analysis. *Microchemical Journal*. 2022;178:107339. doi:10.1016/J.MICROC.2022.107339
62. Morais RP, Lira SP, Selegim MHR, Berlinck RGS. A method for dextruxin analysis by

- HPLC-PDA-ELSD-MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2010;21(12):2262–2271. <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/MFP35vmBqbC5v5Vh3G57KJq/?lang=en>. doi:10.1590/S0103-50532010001200013
63. Han Y, Du J, Li J, Li M. Quantification of the Organic Acids in Hawthorn Wine: A Comparison of Two HPLC Methods. *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 2150. 2019;24(11):2150. <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/11/2150/htm>. doi:10.3390/MOLECULES24112150
64. Lian Z, Dai L, Zhang R, Liu Y, Zhou X, Xu Y. Efficient aerobic fermentation of gluconic acid by high tension oxygen supply strategy with reusable *Gluconobacter oxydans* HG19 cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2022;45(11):1849–1855. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00449-022-02791-z>. doi:10.1007/S00449-022-02791-Z/METRICS
65. Nguyen TM, Goto M, Noda S, Matsutani M, Hodoya Y, Kataoka N, Adachi O, Matsushita K, Yakushi T. The 5-Ketofructose Reductase of *Gluconobacter* sp. Strain CHM43 Is a Novel Class in the Shikimate Dehydrogenase Family. *Journal of bacteriology*. 2021;203(19). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34309403/>. doi:10.1128/JB.00558-20
66. Zeng W, Cai W, Liu L, Du G, Chen J, Zhou J. Efficient biosynthesis of 2-keto-D-gluconic acid by fed-batch culture of metabolically engineered *Gluconobacter japonicus*. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2019;4(3):134–141. doi:10.1016/J.SYNBIO.2019.07.001
67. Li G, Shan X, Zeng W, Yu S, Zhang G, Chen J, Zhou J. Efficient Production of 2,5-Diketo-D-gluconic Acid by Reducing Browning Levels During *Gluconobacter oxydans* ATCC 9937 Fermentation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10:918277. www.frontiersin.org. doi:10.3389/FBIOE.2022.918277/BIBTEX
68. Yuan J, Wu M, Lin J, Yang L. Combinatorial metabolic engineering of industrial *Gluconobacter oxydans* DSM2343 for boosting 5-keto-D-gluconic acid accumulation. *BMC Biotechnology*. 2016;16(1):1–14.

<https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12896-016-0272-y>.
doi:10.1186/S12896-016-0272-Y/TABLES/5

69. Donaire González A, Alcaraz Mas LA. Resonancia magnética nuclear en sistemas paramagnéticos. *Anales de Química de la RSEQ*, ISSN-e 2792-5250, ISSN 1575-3417, N°. 1, 2006, págs. 27-33. 2006;102(1):27–33. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1996645&info=resumen&idioma=SPA>
70. Jordana-Lluch E, Martró Català E, Ausina Ruiz V. La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2012;30(10):635–644. doi:10.1016/J.EIMC.2012.01.012
71. Li K, Mao X, Liu L, Lin J, Sun M, Wei D, Yang S. Overexpression of membrane-bound gluconate-2-dehydrogenase to enhance the production of 2-keto-d-gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*. *Microbial Cell Factories*. 2016 [accessed 2024 Aug 10];15(1):1–10. <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-016-0521-8>. doi:10.1186/S12934-016-0521-8/TABLES/2
72. Zhou X, Zhou X, Xu Y. Improvement of fermentation performance of *Gluconobacter oxydans* by combination of enhanced oxygen mass transfer in compressed-oxygen-supplied sealed system and cell-recycle technique. *Bioresource Technology*. 2017;244:1137–1141. doi:10.1016/J.BIORTECH.2017.08.107

8. Anexos

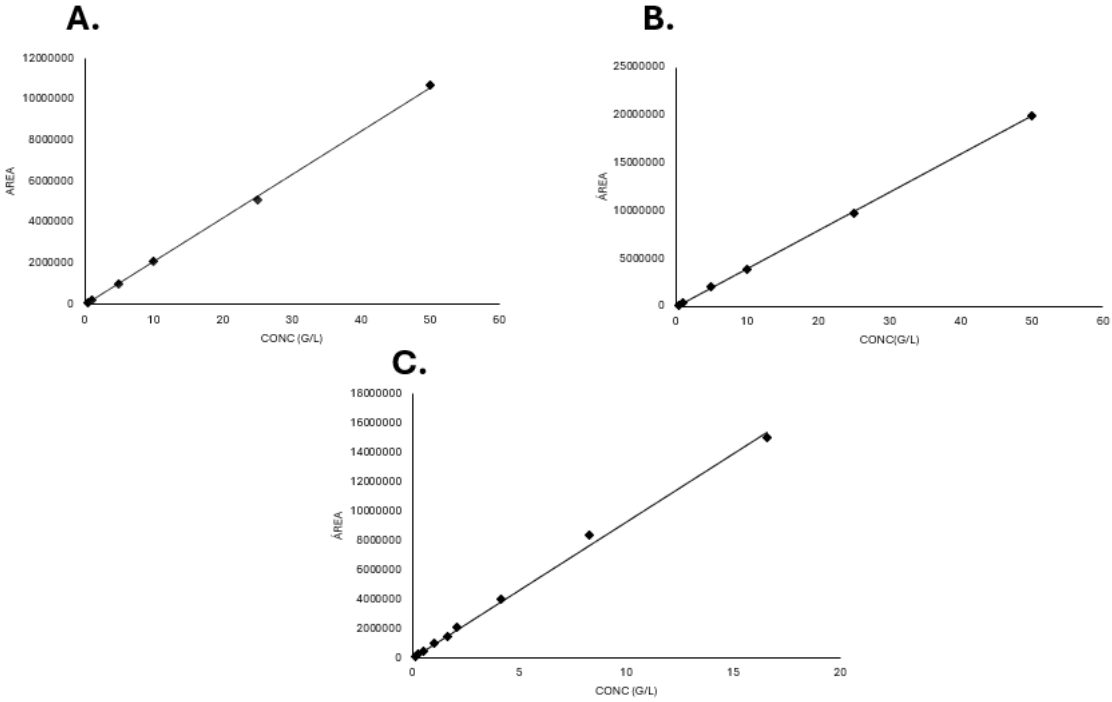


Figura A1. Curvas de calibración realizadas por el grupo de investigación para **(A)** glicerol ($y = 211728x, R^2=0,99$), **(B)** DHA ($y = 397773x, R^2=0,9997$) y **(C)** GA ($y = 928138x, R^2=0,99$).