

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

Biotransformaciones para la revalorización de glicerol

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

Magdalena Ripoll – 182948

Rocío Bravo – 176854

Tutora: Erienne Jackson

Co-Tutora: Lorena Betancor

2017

Declaración de autoría

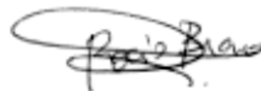
Nosotras, Magdalena Ripoll y Rocío Bravo, declaramos que el trabajo que se presenta en esta obra es de nuestra propia mano.

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



Magdalena Ripoll



Rocío Bravo

15 de marzo de 2017

Agradecimientos

Queremos agradecer especialmente a nuestras tutoras, Erienne Jackson y Lorena Betancor, por darnos la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo; y por el apoyo y buena disposición brindados durante todo este proyecto.

A Alcoholes del Uruguay (ALUR) por brindarnos las muestras de glicerol crudo para nuestra investigación.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay, especialmente a nuestro coordinador 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 padres por su apoyo incondicional en esta etapa y a lo largo de toda la carrera. También a nuestros familiares y amigos, por estar siempre presentes y acompañarnos en esta etapa.

Resumen

El glicerol es el principal producto secundario de la industria del biodiesel. Se estima que para el año 2020 la producción mundial de glicerol crudo, una mezcla variable que contiene metanol sales y cenizas, alcanzará las 3.000 millones de toneladas anuales, superando ampliamente la demanda de este producto. Esto impacta negativamente en el precio del glicerol crudo en el mercado. Resulta de especial interés comercial buscar formas de revalorizar este subproducto. Una estrategia para convertir el glicerol a productos de mayor valor agregado es su biotransformación con bacterias del género *Gluconobacter*. Estas tienen la capacidad de sintetizar dihidroxiacetona (DHA) y ácido glicérico (GA) a partir de glicerol.

En este trabajo se estudió la bioconversión de glicerol, tanto puro como crudo, por células metabólicamente activas pero en estado de reposo (*resting cells*) y células inmovilizadas en termogeles de agar de cepas mutantes de *Gluconobacter frateurii* y *Gluconobacter oxydans*.

Para ello se determinó el mejor estadio de crecimiento para coleccionar las células y obtener máximas conversiones, determinándose además el pH óptimo de reacción para ambas cepas. Se realizó una identificación bioquímica de las cepas en estudio y se desarrolló además un método molecular para la identificación de las mismas y su utilización como control de inóculos. Se desarrollaron cebadores específicos para las cepas mutantes de *G. frateurii* y *G. oxydans* junto con cebadores para el gen del ARNr 16S bacteriano para utilizar como control interno de reacción. Se puso a punto una técnica de *Multiplex Colony PCR* que otorga como resultado un patrón de bandas específico para cada cepa.

Para el caso de las *resting cells* de *G. frateurii*, utilizando glicerol puro como sustrato, se obtuvo un porcentaje de conversión a GA de $41,1 \pm 1,7\%$ y un porcentaje de conversión a DHA de $47,3 \pm 0,7\%$ a las 50 horas de reacción. Al utilizar glicerol crudo como sustrato, se obtuvo un porcentaje de conversión a GA de $8,2 \pm 0,9\%$ y un porcentaje de conversión a DHA de $17,3 \pm 0,3\%$ luego de 50 horas de reacción. Las *resting cells* de *G. oxydans* no presentaron un porcentaje significativo de conversión a GA tanto a partir de glicerol puro como crudo. El porcentaje de conversión a DHA con glicerol puro a las 50 horas de reacción fue de $53,6 \pm 13,7\%$, mientras que con glicerol crudo alcanzó un $58,1 \pm 2,4\%$. Ensayos preliminares con células inmovilizadas de *G. frateurii* y *G. oxydans* en perlas de agar utilizando glicerol puro

como sustrato, mostraron conversión a productos luego de 20 horas de reacción. No existen reportes previos de conversión en estas condiciones.

Palabras clave

Ácido glicérico, biotransformaciones, dihidroxiacetona, glicerol, *Gluconobacter*, inmovilización de microorganismos, *resting cells*.

Abreviaturas

DHA: Dihidroxiacetona

DO: Densidad óptica

GA: Ácido glicérico

h: horas

HPLC: Por sus siglas en inglés, *High Performance Liquid Chromatography*

IUPAC: Unión Internacional de Química Futura y Aplicada

pb: Pares de bases

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

PVP: Polivinilpirrolidona

rpm: Revoluciones por minuto

T_m: Temperatura de *melting*

TMFD: N, n, n, n-tetrametil-p-fenilendiamina

Índice

1. Introducción	11
1.1. La industria del biodiesel y su principal subproducto: el glicerol	11
1.2. Revalorización del glicerol crudo	12
1.3. El género <i>Gluconobacter</i> y la producción de DHA y GA	15
2. Objetivos	19
2.1. Objetivo general	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. Metodología	20
3.1. Materiales	20
3.1.1. Material biológico	20
3.1.2. Reactivos generales	20
3.2. Métodos	21
3.2.1. Obtención de stock bacteriano	21
3.2.2. Identificación bioquímica de las cepas	22
3.2.2.1. Tinción de Gram	22
3.2.2.2. Prueba de la catalasa	22
3.2.2.3. Prueba de la oxidasa	22
3.2.2.4. Crecimiento en medio OF	23
3.2.2.5. Crecimiento en medio suplementado con CaCO ₃	23
3.2.3. Identificación molecular	24
3.2.3.1. Alineamientos	24
3.2.3.2. Diseño de cebadores	24
3.2.3.3. <i>Multiplex Colony PCR</i>	24
3.2.4. Estudios de crecimiento de las cepas	25
3.2.4.1. Curvas de crecimiento	25

3.2.4.2.	Medidas de peso seco.....	26
3.2.5.	Conversión de glicerol puro a DHA y GA.....	27
3.2.5.1.	Conversión con <i>resting cells</i>	27
3.2.5.1.1.	Conversión en distintos estadios de crecimiento.....	27
3.2.5.1.2.	Efecto de pH inicial en la conversión de glicerol puro.....	28
3.2.5.1.3.	Seguimiento temporal de reacciones de conversión.....	28
3.2.5.2.	Conversión con células inmovilizadas.....	29
3.2.6.	Conversión de glicerol crudo a DHA y GA.....	30
3.2.6.1.	Reusos de <i>resting cells</i> para la conversión de glicerol.....	31
3.2.7.	Análisis por HPLC.....	31
4.	Resultados y discusión.....	33
4.1.	Obtención de <i>stock</i> bacteriano y observación del crecimiento en placa.....	33
4.2.	Identificación bioquímica de las cepas.....	34
4.2.1.	Tinción de Gram.....	35
4.2.2.	Prueba de la catalasa.....	35
4.2.3.	Prueba de la oxidasa.....	36
4.2.4.	Crecimiento en medio OF.....	37
4.2.5.	Crecimiento en medio suplementado con CaCO ₃	38
4.3.	Identificación molecular.....	39
4.4.	Desarrollo de método molecular para identificación y control de contaminación de inóculos.....	42
4.5.	Estudios del crecimiento de las cepas.....	47
4.6.	Conversión de glicerol puro a DHA y GA.....	50
4.6.1.	Conversión utilizando <i>resting cells</i>	51
4.6.1.1.	Conversión en distintos estadios de crecimiento.....	51
4.6.1.2.	Efecto de pH inicial en la conversión de glicerol puro.....	54
4.6.2.	Conversión de glicerol puro con células inmovilizadas.....	57

4.7. Conversión de glicerol crudo a DHA y GA	59
5. Análisis económico	63
5.1. Revalorización de glicerol puro.....	63
5.2. Revalorización de glicerol <i>splitting</i>	66
6. Conclusiones	69
7. Referencias bibliográficas.....	71
8. Anexos	75
8.1. Alineamientos de productos de PCR con sus pares teóricos	75
8.2. Curvas de calibración de GA y DHA en HPLC	78

Biotransformaciones para la revalorización de glicerol

1. Introducción

1.1. La industria del biodiesel y su principal subproducto: el glicerol

El biodiesel es una alternativa renovable a los combustibles fósiles. El mismo es producido a partir de aceites vegetales y grasas animales a través de procesos de transesterificación con alcohol generalmente catalizados por NaOH o KOH. El principal producto secundario de la industria del biodiesel es el glicerol, generándose aproximadamente 1 kg de glicerol crudo cada 10 kg de biodiesel (1,2).

El glicerol (1,2,3 propanotriol, $C_3H_8O_3$) es un alcohol trihídrico soluble en agua, sin olor ni color, viscoso y con alto punto de ebullición. La versatilidad de este producto radica en su compatibilidad con un gran número de otras sustancias, su fácil manipulación y el hecho de que no es tóxico para la salud humana ni el medio ambiente (1). Se espera que el mercado mundial del glicerol alcance los 3 billones de dólares para el año 2022, siendo su demanda dominada por las industrias alimenticia, cosmética y farmacéutica (3). Si bien este producto puede ser sintetizado de forma química, en el año 2015 más del 68% de la producción de glicerol provino de la industria del biodiesel (3,4).

A pesar de que el glicerol puro (> 95%) es un producto de gran valor en el mercado, el glicerol crudo obtenido luego del proceso de transesterificación posee contaminantes, alcanzando grados de pureza máximos de entre 60 y 80%, disminuyendo significativamente su valor (1). La composición de este glicerol crudo varía dependiendo del catalizador que se utilice en la reacción de transesterificación, la eficiencia de la misma, el porcentaje de recuperación de biodiesel y la presencia de posibles impurezas en el material de partida. A su vez, la recuperación del metanol y los catalizadores de la reacción también impacta en la pureza del producto obtenido (5). Generalmente el glicerol crudo proveniente de la industria del biodiesel contiene cantidades variables de sales, cenizas, metanol, materia grasa y otros posibles contaminantes encontrados en el agua (5).

Se proyecta que para el año 2020 la producción mundial de glicerol crudo alcanzará las 3.000 millones de toneladas anuales, superando ampliamente la demanda de este producto (1). A nivel de Uruguay, la producción anual de biodiesel por parte de ALUR deja como residuo aproximadamente 20.000 toneladas de glicerol crudo. Actualmente un porcentaje del mismo es comercializado a nivel nacional para su utilización como combustible en hornos industriales. Sin embargo, su combustión lleva a la formación de compuestos tóxicos como la acroleína, por lo que su quema se ve desalentada. Otro porcentaje es destinado a la alimentación animal mientras que el restante es exportado principalmente a Alemania (6). Sin embargo, la oferta supera significativamente la demanda debido al gran aumento en la producción de biodiesel que aconteció en los últimos años, hecho que ha impactado negativamente en el precio del glicerol crudo en el mercado. A su vez, la obtención de glicerol puro para su uso en las industrias química y alimentaria (> 99%) a partir de este residuo es muy costosa (1). Es por estas razones que resulta de especial interés comercial buscar formas de revalorizar este subproducto.

1.2. Revalorización del glicerol crudo

El glicerol crudo es un residuo con gran potencial para su revalorización, encontrando usos en diversas industrias como tal o a través de su conversión a otros productos de mayor valor agregado. Mientras la producción de biodiesel continúa creciendo, el mercado del glicerol crudo se ve cada vez más afectado, por lo que su comercio como tal no supone grandes ganancias (1). Sin embargo, en los últimos años se han encontrado usos para el glicerol crudo sin procesar que suponen un cierto rédito económico. Entre ellos se encuentra su utilización como biocombustible en hornos industriales, práctica que como ya se ha mencionado, acarrea la producción de tóxicos como la acroleína (6). Otra alternativa que involucra el glicerol crudo como tal es su agregado como ingrediente en raciones de alimento para ganado, tanto rumiantes como no rumiantes (5). El agregado de glicerol crudo a estas raciones ha probado ser beneficioso en todos los casos, sin embargo, el exceso del residuo en estos alimentos puede afectar la fisiología y el metabolismo de los animales (5). Existen además otros potenciales usos para el glicerol crudo, por ejemplo su empleo como solvente orgánico “verde” para numerosas reacciones, su uso como combustible para producir electricidad a partir de celdas microbianas y su función como fuente de carbono para la remoción del nitrato en procesos de desnitrificación de agua (5).

Otra opción para la revalorización del glicerol crudo, es su conversión a otros productos de mayor valor agregado. Para ello existen procesos de conversión química convencional y bioconversiones (5). Estos primeros implican condiciones extremas de reacción y la utilización de catalizadores químicos por lo que generalmente tienen un alto impacto ambiental. Entre los productos obtenidos por conversiones químicas se encuentra la triacetina, un aceite transparente de grado alimenticio que se obtiene a partir de glicerol crudo y ácido acético sin el empleo de un catalizador (7). Otro producto obtenido a través de una conversión química convencional es el (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4il) metil acetato, utilizado como aditivo que aporta viscosidad al biodiesel (5). Por otra parte, la ya mencionada acroleína puede utilizarse como bloque de construcción para la producción de detergentes, polímeros de ésteres de ácido acrílico y polímeros superabsorbentes (5). Otra alternativa de revalorización del glicerol crudo de la industria del biodiesel es la producción de gas hidrógeno, proceso que se está estudiando actualmente en Uruguay por Veiga y colaboradores (6,8). Esta reacción precisa de catalizadores, temperaturas que oscilan entre los 450 y 650 °C dependiendo del proceso y da como resultado una mezcla gaseosa rica cuyos mayores componentes son H₂, CO₂ y CO (8).

Las bioconversiones son una alternativa “verde” a las conversiones químicas clásicas. Estas implican la utilización de enzimas o microorganismos como catalizadores (9). Las enzimas son catalizadores naturales, biocompatibles, biodegradables y pueden derivar de fuentes renovables. A diferencia de las reacciones químicas convencionales, las enzimas generalmente trabajan en condiciones suaves de temperatura, presión y pH (10). Sin embargo, el uso de enzimas tiene desventajas. Entre estas se destacan la poca estabilidad del catalizador fuera de las condiciones óptimas de trabajo, la necesidad de co-sustratos y/o co-factores que deben ser agregados constantemente a la mezcla de reacción y sus costos debido a la complejidad de la obtención de las mismas en forma pura (9).

La utilización de microorganismos para realizar la bioconversión a productos de mayor valor agregado tiene ciertas ventajas sobre el empleo de enzimas. En primera instancia, una célula microbiana es por lo general más resistente a los cambios en su entorno que una enzima en solución (9). Por otro lado, dentro de un microorganismo conviven varias enzimas de una misma vía metabólica, responsables de la transformación de un producto en otro. Esto se presenta como una ventaja en el caso de reacciones que requieran múltiples

pasos (9). Además, al trabajar con microorganismos completos, el agregado de cofactores no es un problema ya que la propia célula los produce y se encarga de reciclarlos (9).

De todas formas, cabe mencionar que muchas veces al trabajar con microorganismos en crecimiento se generan reacciones secundarias y por ende productos no deseados, por lo que es necesario minimizar la ocurrencia de este tipo de reacciones. Una forma de minimizar estas reacciones es trabajar con células en condiciones de no-crecimiento, llamadas por su nombre en inglés *resting cells* (11). Estas células no se encuentran en crecimiento, pero están metabólicamente activas. Por esta razón tienen un gran potencial en biotransformaciones redox dependientes de cofactores ya que no necesitan gastar su energía en la producción de biomasa (12). Las *resting cells* pueden estar en suspensión o inmovilizadas. La inmovilización de las mismas acarrea además otras ventajas operacionales como, por ejemplo, facilitar su separación y el consecuente reuso, reduciendo costos, aumentando la estabilidad y productividad del proceso y protegiendo las células de las condiciones del medio externo (13). Existen numerosos soportes tanto orgánicos como inorgánicos para la inmovilización de células, ejemplos de los mismos son los hidrogeles iónicos, las espumas de poliuretano, las matrices sol-gel, los geles sintéticos y los termogeles de agar y agarosa (11,13).

La mayoría de los compuestos de mayor valor agregado obtenidos a partir de glicerol crudo son producto de reacciones de bioconversión utilizando microorganismos. Estos son muy variados y se obtienen a través de reacciones con células en crecimiento o *resting cells*, tanto libres como inmovilizadas, de una gran variedad de especies microbianas. Entre ellos se encuentra el 1,3 propanodiol que es obtenido utilizando como catalizadores especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Este compuesto sirve como monómero para la producción de polímeros fotoestables y es utilizado en las industrias química, alimenticia y farmacéutica (14). Otro compuesto obtenido a partir del glicerol crudo es el ácido cítrico, utilizando como catalizador la bacteria *Yarrowia lipolytica* (5). Este ácido es de importancia en las industrias química, farmacéutica, alimenticia y agropecuaria (14). También es posible la producción de hidrógeno por parte de *Rhodospseudomonas palustris*, a través de reacciones de conversión foto-fermentativa del glicerol crudo (5). La producción de bioplásticos, como los polihidroxialcanoatos (PHAs) por parte de especies como *Cupriavidus necator*, *Zobellella denitrificans* y *Pseudomonas oleovorans* es otro ejemplo

de la gran variedad de productos que se pueden obtener a partir de la bioconversión del glicerol crudo (5,14).

En particular, este trabajo tiene su foco en la producción de otros dos compuestos de alto valor agregado, la dihidroxiacetona (DHA) y el ácido glicérico (GA), ambos producidos por bacterias del género *Gluconobacter*.

1.3. El género *Gluconobacter* y la producción de DHA y GA

El género *Gluconobacter* pertenece a la familia *Acetobacteraceae*. Linajes de *Gluconobacter* han sido encontrados en flores, tierra de jardín, miel de abeja, frutas, sidra, cerveza, vino y vinagre de vino (15). Las especies del género *Gluconobacter* han mostrado no tener efectos patogénicos ni para el hombre ni para otros animales (16). Este género está constituido por bacterias del ácido acético con forma de bastones, Gram negativas que no forman endosporas. Son aerobias obligatorias, teniendo un metabolismo estrictamente respiratorio con oxígeno como aceptor final de electrones. Su temperatura óptima de crecimiento está entre los 25 y 30 °C y su pH óptimo es de 5,5.

En cuanto a las pruebas bioquímicas, las especies de *Gluconobacter* son catalasa positivas, oxidasa negativas, no reducen nitrato, no producen indol ni forman H₂S (16). Al igual que múltiples especies de bacterias del ácido acético, las bacterias del género *Gluconobacter* son capaces de la oxidación incompleta de carbohidratos y alcoholes a aldehídos, cetonas y ácidos orgánicos.

Este género es de gran importancia en la industria para la producción de L-sorbosa a partir de D-sorbitol, ácido D-glucónico, ácido 5 - ceto - y 2 - cetoglucónico a partir de D - glucosa; y DHA y GA a partir de glicerol (16). Como se mencionó con anterioridad, este trabajo se enfoca en la producción de estos dos últimos. Las vías para su formación a partir de glicerol se esquematizan en la Figura 1.

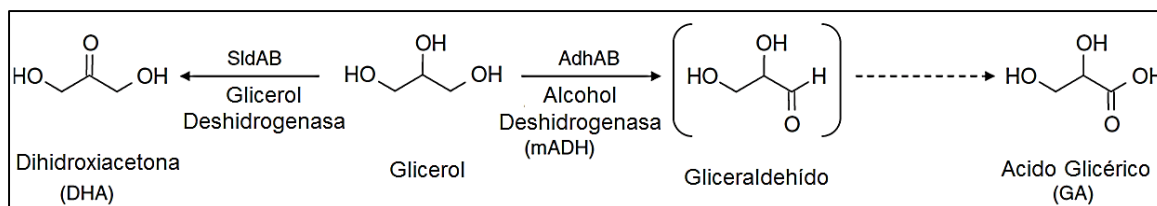


Figura 1: Vías para la formación de GA y DHA a partir de glicerol por *Gluconobacter* spp. La flecha discontinua indica una reacción enzimática no identificada en la formación de GA. AdhAB, alcohol deshidrogenasa asociada a la membrana, denominada mADH; SldAB, glicerol deshidrogenasa asociada a la membrana, denominada SLDH o GLDH. Adaptado de Sato y colaboradores (17).

La DHA (1,3-dihidroxi-2-propanona, $C_3H_6O_3$) es una cetotriosa que se produce en la remolacha azucarera y la caña de azúcar como producto de la oxidación del glicerol (14). Su peso molecular es de 90,08 g/mol y su punto de fusión se encuentra entre los 75 y 80 °C. Es un polvo blanco, higroscópico con sabor dulce y refrescante y aroma característico. Es el representante más simple de las cetosas conocidas, no posee centros quirales ni muestra actividad óptica (18).

En el año 1970, la DHA fue incluida por la *Food and Drug Administration* (FDA) en la lista de componentes cosméticos permitidos (18). Es ampliamente conocida y utilizada como agente bronceante ya que en contacto con la piel cambia el color a una tonalidad marrón. Este cambio de coloración resulta de una reacción de la DHA con grupos de aminoácidos libres de arginina que ocurre en la cutícula (18). La DHA no solo encuentra usos en la cosmética, sino que también en la dermatología como agente terapéutico en el tratamiento de enfermedades como la Leucoderma y la Porfiria variegata (18). También oficia como materia prima para la producción de sustancias químicas de importancia desde el punto de vista industrial, tales como el 1,2-propilenglicol, el ácido láctico, el metotrexato, los tensioactivos, etc (14).

La DHA puede ser sintetizada por dos métodos, el químico y el microbiológico (18). La síntesis química puede proceder a través de la oxidación catalítica de glicerol o condensación de formaldehído con carbonato de calcio. Tal proceso de transformación de glicerol en DHA procede de un modo no homogéneo, adicionalmente resulta en la formación de compuestos complejos y difíciles de eliminar, y el rendimiento de reacción no es satisfactorio (18).

Por otra parte, los métodos microbiológicos consisten en la oxidación parcial de glicerol a DHA mediante cepas seleccionadas de bacterias de ácido acético como *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter melanogenus*, y *Acetobacter xylinum*. Estas cepas se caracterizan por presentar una alta actividad de glicerol deshidrogenasa, enzima que cataliza esa reacción (18). La oxidación del glicerol por las bacterias del ácido acético puede darse por dos vías resultando en la producción de DHA. La primera vía ocurre en ausencia de adenosina trifosfato (ATP) y nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), procede a pH 6. La única enzima que cataliza esa reacción es la glicerol deshidrogenasa ubicada en la membrana (18). La segunda vía de transformación de glicerol ocurre a pH 8,5 y requiere la presencia de ATP, NAD, iones Mg^{2+} y de la enzima glicerol quinasa (18). La cepa más ampliamente estudiada para la producción de DHA es *Gluconobacter oxydans* (14).

El ácido glicérico (ácido 2,3-dihidroxiopropiónico, $C_3H_6O_4$) se encuentra naturalmente como un componente fitoquímico en una gran variedad de plantas, tales como maní, alcachofa, manzana, banana y uva, aunque las composiciones enantioméricas y sus concentraciones permanecen desconocidas (14). El GA también está presente en el cuerpo humano como un metabolito, formado como un producto de la ruptura de la fructosa. A su vez, sus derivados fosfato son intermediarios importantes en la vía glicolítica. Con excepción de pocas propiedades como su peso molecular de 106,08 g/mol, su pKa de 3,5, y su completa miscibilidad en agua, los datos sobre las propiedades fisiológicas y químicas de GA son escasos (19).

Existen varias patentes que implican la aplicación de GA como materia prima para productos químicos, farmacéuticos y cosméticos. En particular, se ha reportado que este compuesto y sus derivados presentan actividad biológica, estimulando la actividad colessterolítica en perros y acelerando la eliminación de etanol y la oxidación del acetaldehído en ratas (19). A su vez, se ha reportado que la utilización de GA como monómero o co-monómero con otros ácidos hidrocarboxílicos resulta en polímeros que pueden ser aplicables como sistemas de *delivery* drogas (19). El GA también está siendo estudiado como material de partida para la preparación de tensioactivos que pueden ser utilizados en la industria textil para el acondicionamiento “verde” de telas (19). De todas formas, el GA no es producido a granel, probablemente debido a que todavía no se han desarrollado un número considerable de aplicaciones para este producto químico. Sin

embargo, la molécula de GA, con tres grupos funcionales, parece tener un enorme potencial como un químico que agrega valor al glicerol (19).

Al igual que la DHA, el GA puede sintetizarse químicamente y mediante biocatálisis. Químicamente el GA se sintetiza por oxidación selectiva del grupo alcohólico primario del glicerol por catalizadores heterogéneos de paladio (Pd), platino (Pt) y oro (Au) soportados sobre carbono (14). La quimioselectividad de los catalizadores es importante en el sentido de que la oxidación del grupo alcohol primario produce GA, mientras que la oxidación del grupo alcohol secundario forma la DHA. La mejor quimioselectividad se logra en condiciones básicas y en presencia de catalizadores de Au o Pd. La síntesis catalítica no es la ruta preferida para la producción de GA, ya que el proceso no es favorable al medio ambiente, produciéndose altas concentraciones de ácidos minerales como subproductos (14).

La biosíntesis de GA se produce por oxidación aeróbica del glicerol por bacterias pertenecientes a la familia del ácido acético. Estos son *Gluconobacter*, *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* (14). El GA fue originalmente conocido como un subproducto de la producción de DHA a partir de glicerol por *Gluconobacter oxydans*, pero poco trabajo se ha centrado en la producción biotecnológica de GA como un compuesto objetivo (19).

La bioquímica de la producción de GA no ha sido estudiada en detalle hasta ahora. Sin embargo, está reportado que uno de los primeros pasos de la conversión de glicerol a gliceraldehído, para su posterior transformación a GA, está catalizado por la enzima alcohol deshidrogenasa (mADH) (Fig. 1) (17). Sato y colaboradores han observado que una delección en el gen *adhA* (que codifica para la enzima mADH) en una cepa *G. oxydans* resulta en una pérdida total en la producción de GA por parte de esta bacteria, indicando que es una enzima clave en la vía de síntesis de GA (17). Existen diferencias entre la síntesis química y biológica del GA. La síntesis química de GA siempre produce una mezcla racémica de D y L- GA, mientras que la síntesis biológica preferentemente produce la forma D en exceso enantiomérico sobre la forma L (14). Un estudio reciente ha demostrado que *Gluconobacter frateurii* es la cepa con mayor potencial para la producción de D-GA (2,20). También se han obtenidos buenos rendimientos utilizando *Gluconobacter sp* 3259 (19).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es estudiar la bioconversión de glicerol en DHA y GA por especies mutantes de *G. frateurii* y *G. oxydans* en suspensión.

2.2. Objetivos específicos

- Estudiar el crecimiento de las cepas seleccionadas de *Gluconobacter*.
- Identificar por pruebas bioquímicas.
- Desarrollar un método molecular para identificación y control de contaminación de inóculos.
- Estudiar y optimizar la conversión del glicerol puro a DHA y GA por *resting cells* libres e inmovilizadas.
- Estudiar la conversión con glicerol crudo por *resting cells*.

3. Metodología

3.1. Materiales

3.1.1. Material biológico

Las ampollas conteniendo las cepas liofilizadas de *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465, *Gluconobacter oxydans* NBRC 14819 y *Gluconobacter sp.* 3259 (en adelante referidas como *G. frateurii*, *G. oxydans* y *Gluconobacter sp.* respectivamente) fueron obtenidas de ATCC (Virginia, EEUU). Las cepas de *E. coli* BL21 y *E. coli* DH5 α fueron obtenidas de New England Biolabs (Massachusetts, EEUU) y *P. aeruginosa* 27853 fue obtenida de ATCC.

3.1.2. Reactivos generales

Los componentes utilizados para la preparación de los medios de cultivo y producción fueron de grado analítico. El sorbitol y la D-Glucosa fueron obtenidos de Amresco (Ohio, EEUU). La peptona y el agar fueron obtenidos de Oxoid (Hampshire, Reino Unido). El MgSO₄·7H₂O fue obtenido de Biopack (Buenos Aires, Argentina). El extracto de levadura y el medio Difco OF Basal Medium fueron obtenidos de BD Biosciences (California, EEUU). El KH₂PO₄ fue obtenido de Emsure (Massachusetts, EEUU). El K₂HPO₄ fue obtenido de Dorwil (Buenos Aires, Argentina). El CaCO₃ fue obtenido de la Droguería Industrial Uruguay (Montevideo, Uruguay). El glicerol puro utilizado en las reacciones de conversión fue obtenido de Carlo Erba (Barcelona, España). El glicerol crudo producto del proceso de *splitting*, en adelante referido como glicerol *splitting* (Agua < 12%, cenizas < 7%, glicerol 70-80%, materia grasa < 1%, metanol < 5%, cloruros < 3%) fue donado por Alcoholes del Uruguay (ALUR).

La enzima ADN polimerasa, su cofactor Mg (MgCl₂) y el *buffer* de la enzima fueron obtenidos de Tiangen (Beijing, China). Los dNTPs fueron obtenidos de Thermo Scientific (Massachusetts, EEUU). Para la electroforesis se utilizó agarosa de Tiangen y

E-Z *vision* de Amresco como agente intercalante. Se emplearon los marcadores de peso molecular *Quick-Load 50 bp DNA Ladder* de New England Biolabs (Massachusetts, EEUU) y *GeneRuler Ladder Mix SM0331* de Thermo Scientific.

Los estándares para el HPLC fueron de grado analítico. La sal de ácido D-Glicérico fue obtenida de Sigma Aldrich (Misuri, EEUU). La dihidroxiacetona fue obtenida de Merck (Darmstadt, Alemania). La columna Rezex RHM – Monosaccharide H⁺ (8%) y la precolumna con cartuchos Carbo-H 4 x 3.0 mm fueron obtenidas de Phenomenex (California, EEUU).

3.2. Métodos

3.2.1. Obtención de stock bacteriano

Las ampollas conteniendo las cepas de *Gluconobacter* fueron abiertas bajo esterilidad. Una vez abiertas se resuspendió el liofilizado en 500 µL de medio líquido de recuperación (sorbitol 50 g/L, extracto de levadura 10 g/L, peptona 10 g/L, pH 6 ajustado con HCl). Los 500 µL de la suspensión bacteriana fueron traspasados a un recipiente estéril conteniendo 3 mL de medio líquido de recuperación. Se procedió a tomar 250 µL de la nueva suspensión bacteriana y colocarlos en una placa de medio sólido de recuperación (sorbitol 50 g/L, extracto de levadura 10 g/L, peptona 10 g/L, agar 15 g/L, pH 6 ajustado con HCl) para luego esparcirlos con un rastrillo estéril por la placa, este procedimiento se realizó por duplicado. Las placas se colocaron en estufa a 30 °C por 48 horas.

La suspensión bacteriana restante se colocó en un agitador a 26 °C y 200 rpm por 48 horas. Los procedimientos anteriormente mencionados se repitieron para cada una de las cepas (*G. frateurii*, *G. oxydans* y *Gluconobacter sp.*). Luego de 48 horas de crecimiento, se procedió a generar un stock del cultivo de cada una de las cepas, para esto, se prepararon criotubos conteniendo 1 mL de cultivo con glicerol al 30%. Los criotubos fueron almacenados a -80 °C.

Posteriormente se realizaron estrías de cada microorganismo en medio de crecimiento sólido (peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, D-glucosa 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, agar 15 g/L, pH 6,5).

3.2.2. Identificación bioquímica de las cepas

3.2.2.1. Tinción de Gram

Se siguió el protocolo de tinción de acuerdo a bibliografía (21). Se prepararon frotis a partir de colonias aisladas de *G. frateurii*, *G. oxydans* y *Gluconobacter sp.* Se fijaron con calor. Se agregó cristal violeta por 1 minuto y se lavó con agua destilada. Luego se agregó lugol por 1 minuto y se removió con agua destilada. Posteriormente se agregó etanol 95% y se dejó actuar por 30 segundos, se lavó con más etanol seguido de agua destilada. Finalmente se agregó safranina por 10 segundos y se lavó con agua destilada. Los preparados se dejaron secar y se observaron al microscopio con un objetivo de 100x utilizando aceite de inmersión.

3.2.2.2. Prueba de la catalasa

Para realizar la prueba de la catalasa se siguió el protocolo de acuerdo con la bibliografía (21). Se tomaron colonias aisladas de *G. frateurii*, *G. oxydans* y *Gluconobacter sp* que se esparcieron ligeramente en una placa de vidrio. Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre la muestra y se observó la reacción.

3.2.2.3. Prueba de la oxidasa

La técnica se realizó de acuerdo a la bibliografía (21). Se muestrearon colonias de *G. frateurii*, *G. oxydans*, *Gluconobacter sp*, *E. coli* BL21 como control negativo y *P. aeruginosa* 27853 como control positivo. Se colocó cada muestra sobre una superficie de papel de filtro. Para coleccionar la muestra de la prueba de la oxidasa se empleó un anillo de plástico para evitar resultados positivos falsos. A continuación

se colocó una gota del reactivo N, n, n, n-tetrametil-p-fenilendiamina (TMFD) sobre la muestra y se dejó actuar.

3.2.2.4. Crecimiento en medio OF

Se inocularon tubos de medio Difco OF Basal Medium suplementado con D-glucosa al 1% con colonias aisladas de *G. frateurii*, *G. oxydans*, *Gluconobacter sp* y *E. coli* DH5 α como control. Los tubos se dejaron semi abiertos en estufa a 30 °C por 48 horas de acuerdo a las indicaciones del fabricante (BD Biosciences).

3.2.2.5. Crecimiento en medio suplementado con CaCO₃

Se realizaron precultivos de *G. frateurii*, *G. oxydans* y *Gluconobacter sp* en medio de crecimiento con glucosa (peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, D-glucosa 5 g/L, MgSO₄.7H₂O 1 g/L, pH 6,5). Se dejaron crecer 16 horas a 30 °C y 210 rpm. Se midió la DO a 600 nm (DO_{600 nm}) de los precultivos y se centrifugaron volúmenes correspondientes a 0,068 mg de células a 5.000 rpm por 10 minutos. Las medidas de DO_{600 nm} fueron tomadas en el espectrofotómetro BioSpec-mini de Shimadzu (Kioto, Japón).

Para el sembrado de la placa se adaptó el protocolo de Boonsaner y colaboradores (22). Los *pellets* bacterianos se resuspendieron en 50 μ L de *buffer* fosfato 30 mM (NaH₂PO₄ 4,14 g/L, K₂HPO₄ 5,23 g/L, pH 7) y posteriormente se sembraron 10 μ L de cada una de las cepas en una placa de medio de crecimiento CaCO₃ (glicerol 50 g/L, peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, MgSO₄.7H₂O 1 g/L, CaCO₃ 5 g/L, agar 15 g/L). Se realizó además una estría apretada de *E. coli* DH5 α en la misma placa como control negativo. La placa se mantuvo en estufa a 30 °C por 48 horas.

3.2.3. Identificación molecular

3.2.3.1. Alineamientos

Se obtuvieron los genomas completos de *Gluconobacter frateurii* y *Gluconobacter oxydans*, así como la secuencia parcial del gen del ARNr 16S de *Gluconobacter sp* y la secuencia completa del gen del ARNr 16S de *E. coli* BL21 de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Se realizó un alineamiento de los dos genomas completos y otro de los genes del ARNr 16S de las tres cepas en estudio junto con el de *E. coli* utilizando el programa *CLC Sequence Viewer 7* de CLCbio (Aarhus, Dinamarca).

3.2.3.2. Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores se utilizó la herramienta *online* Primer3 (disponible desde: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Se comprobó *in silico* la potencial formación de dímeros de cebadores con la herramienta *Multiple Primer Analyzer* de Thermo Scientific, así como las posibilidades de amplificación inespecífica con la herramienta BLAST del NCBI. La síntesis de los cebadores fue llevada a cabo por la empresa Macrogen (Seúl, Corea).

3.2.3.3. Multiplex Colony PCR

Se llevó a cabo una reacción de *Multiplex Colony PCR* utilizando los cebadores previamente diseñados, donde se amplificaron fragmentos específicos de *G. frateurii*, *G. oxydans* y del gen del ARNr 16S. Como ADN molde se utilizaron colonias de las distintas cepas de *Gluconobacter* en estudio y de *E. coli* BL21. La reacción se llevó a cabo en 25 μ L conteniendo 0,8 mM de cada cebador, *Buffer* Taq 1x, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1,25 U de enzima Taq polimerasa y agua ultrapura c.s.

Las condiciones de ciclado fueron establecidas teniendo en consideración la ruptura de las células y liberación del ADN, así como también la temperatura de *annealing* de los cebadores utilizados (Tabla 1). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador *Little Genius* de Bioer (Binjiang, China).

Tabla 1: Condiciones de ciclado para la reacción de *Multiplex Colony* PCR

Número de ciclos	Duración	Temperatura	Suceso
1 ciclo	5 min	95°C	Ruptura de células y desnaturalización del ADN
35 ciclos	1 min	95°C	Desnaturalización
	1:30 min	57°C	<i>Annealing</i>
	1 min	72°C	Extensión
1 ciclo	5 min	72°C	Extensión final

Para la visualización de los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando *EZ-vision* (1x) como agente intercalante. Los geles se visualizaron mediante el transiluminador *E-Gel Imager* de Thermo Scientific.

La validación de la técnica constó de dos etapas, la primera fue la repetición de los ensayos cinco veces. La segunda constó de verificar la identidad de los fragmentos obtenidos por secuenciación y posterior alineamiento con las secuencias obtenidas del NCBI. Los alineamientos fueron llevados a cabo con el programa *CLC Sequence Viewer 7*.

3.2.4. Estudios de crecimiento de las cepas

3.2.4.1. Curvas de crecimiento

Se estudió el crecimiento de las cepas de *G. frateurii* y *G. oxydans* en medio de crecimiento con glucosa (peptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, D-glucosa 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, pH 6,5) y en medio de crecimiento con glicerol (glicerol

100 g/L, peptona 9 g/L, extracto de levadura 1 g/L, KH_2PO_4 0,9 g/L, K_2HPO_4 0,1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, pH 6) a 30 °C.

Se realizaron precultivos a partir de colonias aisladas de *G. frateurii* y *G. oxydans* inoculando 3 mL de medio de crecimiento con glucosa. Se dejaron crecer 16 horas a 30°C y 210 rpm. Posteriormente se inocularon matraces de 1 L conteniendo 250 mL de los medios a ensayar con 250 μL de precultivo para *G. frateurii* ($\text{DO}_{600 \text{ nm}} = 3$) y 2,5 mL para *G. oxydans* ($\text{DO}_{600 \text{ nm}} = 0,6$). Se dejaron crecer por 76 horas a 30 °C y 210 rpm tomando muestras periódicamente para medir $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$. Las medidas de $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ fueron tomadas en el equipo BioSpec-mini de Shimadzu.

3.2.4.2. Medidas de peso seco

Para las medidas de peso seco se adaptó el protocolo establecido por Black y Nair (23). Se inocularon matraces de 1 L conteniendo 250 mL de medio de crecimiento con glicerol con precultivos de *G. frateurii* y *G. oxydans*. Se dejaron crecer a 30 °C y 210 rpm hasta alcanzar una medida de $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ de 3.

A partir de los cultivos concentrados se prepararon diluciones en *buffer* fosfato 30 mM con un volumen final de 50 mL por duplicado en tubos previamente pesados en balanza analítica, obteniendo suspensiones bacterianas con $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ de 0,4, 0,6, 1, 1,5, 2,5 y 3. Las medidas de $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ fueron tomadas en el equipo BioSpec-mini de Shimadzu.

Se centrifugaron las suspensiones bacterianas por 10 minutos a 5.000 rpm y se descartó el sobrenadante. El *pellet* bacteriano fue lavado con 5 mL de agua destilada y centrifugado nuevamente por 10 minutos a 5.000 rpm. Posteriormente se descartó el agua de lavado y se dejó secar el *pellet* resultante por 48 horas en estufa a 60 °C.

Se pesaron los tubos conteniendo los *pellets* secos en la misma balanza analítica hasta obtener un peso constante y se restó el peso inicial de cada tubo para obtener el peso seco del contenido. Se elaboró un gráfico de $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ vs peso seco (g/L).

3.2.5. Conversión de glicerol puro a DHA y GA

3.2.5.1. Conversión con *resting cells*

3.2.5.1.1. Conversión en distintos estadios de crecimiento

Se realizaron precultivos de *G. frateurii* y *G. oxydans* en medio de crecimiento con glucosa y se dejaron crecer 16 horas a 30 °C y 210 rpm. Con estos se inocularon 4 matraces de 1 L conteniendo 250 mL de medio de crecimiento con glicerol puro. Se dejó crecer los cultivos a 30 °C y 210 rpm hasta obtener cultivos con DO_{600 nm} de 0,4, 1, 2,5 y 3. Posteriormente se centrifugó el volumen necesario para obtener 1,7 mg de peso seco por 15 minutos a 5.000 rpm. El *pellet* bacteriano fue lavado para remover el medio de crecimiento con *buffer* fosfato de lavado 30 mM (NaH₂PO₄ 4,14 g/L, K₂HPO₄ 5,23 g/L, pH 7) y fue posteriormente centrifugado a 5.000 rpm por 15 minutos, eliminando el sobrenadante.

Las conversiones de glicerol por *resting cells* de *G. frateurii* y *G. oxydans* se llevaron a cabo en matraces de 250 mL con un volumen de 30 mL de medio de reacción suplementado con glicerol puro (glicerol 50 g/L, KH₂PO₄ 0,9 g/L, K₂HPO₄ 0,1 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L) que fue inoculado con los 1,7 mg de peso seco obtenidos previamente. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C y 210 rpm durante 20 horas, por duplicado. Al finalizar cada ensayo se tomaron muestras de 1 mL que fueron centrifugadas a 15.000 rpm por 30 minutos para eliminar el *pellet* bacteriano y el sobrenadante fue disuelto 5 veces en agua mQ para su análisis por HPLC.

3.2.5.1.2. Efecto de pH inicial en la conversión de glicerol puro

Se realizaron precultivos de *G. frateurii* y *G. oxydans* en medio de crecimiento con glucosa y se dejaron crecer 16 horas a 30 °C y 210 rpm. Con estos se inoculó un matraz de 1 L conteniendo 250 mL de medio de crecimiento con glicerol puro. Se dejó crecer los cultivos a 30 °C y 210 rpm hasta obtener una DO_{600 nm} de 1, transcurrido ese tiempo se detuvo el crecimiento. Posteriormente se centrifugó el volumen necesario para obtener 1,7 mg de peso seco por 15 minutos a 5.000 rpm. El *pellet* bacteriano fue lavado para eliminar rastros del medio de crecimiento con *buffer* fosfato de lavado 30 mM y fue posteriormente centrifugado a 5.000 rpm por 15 minutos, eliminando el sobrenadante.

Las conversiones de glicerol por *resting cells* de *G. frateurii* y *G. oxydans* se llevaron a cabo en matraces de 250 mL con un volumen de 30 mL de medio de reacción suplementado con glicerol puro a distintos pH (3,0, 4,0, 6,0, 7,0 y 8,0) que fue inoculado con los 1,7 mg de peso seco obtenidos previamente. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C y 210 rpm durante 50 horas, por duplicado. Al finalizar cada ensayo se tomaron muestras de 1 mL que fueron centrifugadas a 15.000 rpm por 30 min para eliminar el *pellet* bacteriano y el sobrenadante fue disuelto al quinto en agua mQ para su análisis por HPLC. Paralelamente, se midió el pH del medio de reacción.

3.2.5.1.3. Seguimiento temporal de reacciones de conversión

Se realizaron precultivos de *G. frateurii* y *G. oxydans* en medio de crecimiento con glucosa y se dejaron crecer 16 horas a 30 °C y 210 rpm. Con estos se inoculó un matraz de 1 L conteniendo 250 mL de medio de crecimiento con glicerol puro. Se dejó crecer los cultivos a 30 °C y 210 rpm hasta obtener una DO_{600 nm} de 1, transcurrido ese tiempo se detuvo el crecimiento. Posteriormente se centrifugó el volumen necesario para obtener 1,7 mg de peso seco por 15

minutos a 5.000 rpm. El *pellet* bacteriano fue lavado para eliminar rastros del medio de crecimiento con *buffer* fosfato de lavado 30 mM y fue posteriormente centrifugado a 5.000 rpm por 15 minutos, eliminando el sobrenadante.

Las conversiones de glicerol por *resting cells* de *G. frateurii* y *G. oxydans* se llevaron a cabo en matraces de 250 mL con un volumen de 30 mL de reacción de reacción suplementado con glicerol puro a pH 8 para *G. frateurii* y pH 6 para *G. oxydans*, inoculados con los 1,7 mg de peso seco obtenidos previamente. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C y 210 rpm, por duplicado. Se tomaron muestras de 1 mL a las 3, 6, 20, 26, 30, 50, 100 y 125 horas de reacción para *G. frateurii* y a las 3, 6, 20, 26, 30, 50, 110 y 120 horas de reacción para *G. oxydans*. Las muestras fueron centrifugadas a 15.000 rpm por 30 minutos para eliminar el *pellet* bacteriano y el sobrenadante fue disuelto al quinto en agua mQ para su análisis por HPLC. Paralelamente, se midió el pH del medio de reacción a partir del sobrenadante de las muestras obtenidas.

3.2.5.2. Conversión con células inmovilizadas

Se realizaron precultivos de *G. frateurii* y *G. oxydans* en medio de crecimiento con glucosa y se dejaron crecer 16 horas a 30 °C y 210 rpm. Con estos se inoculó un matraz de 1 L conteniendo 250 mL de medio de crecimiento con glicerol puro. Se dejó crecer los cultivos a 30 °C y 210 rpm hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}}$ de 1, transcurrido ese tiempo se detuvo el crecimiento.

Para realizar la inmovilización de las células en agar se siguió el protocolo reportado por Trelles y Rivero (13). Se centrifugó el volumen necesario para obtener 1,7 mg de peso seco por 15 minutos a 5.000 rpm. El *pellet* bacteriano fue lavado para remover el medio de crecimiento con *buffer* fosfato de lavado 30 mM y fue posteriormente centrifugado a 5.000 rpm por 15 minutos, eliminando el sobrenadante. Se preparó una solución de agar al 3% y se resuspendió el *pellet* bacteriano en 3 mL de la misma. Se prepararon perlas de agar por goteo en aceite de girasol frío. Las mismas se lavaron con hexano y luego con agua destilada.

Las conversiones de glicerol por inmovilizados de *resting cells* de *G. frateurii* y *G. oxydans* se llevaron a cabo en matraces de 250 mL con un volumen de 30 mL de medio de reacción suplementado con glicerol puro a pH 8 para *G. frateurii* y pH 6 para *G. oxydans*, inoculado con las perlas de agar conteniendo los 1,7 mg de peso seco obtenidas previamente. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C y 210 rpm durante 20 horas, por duplicado. Al finalizar el ensayo se tomaron muestras de 1 mL de cada uno de los matraces. Se separó la mezcla de reacción de las perlas de agar, se tomaron muestras del sobrenadante y se diluyeron al quinto en agua mQ para su análisis por HPLC.

3.2.6. Conversión de glicerol crudo a DHA y GA

Se realizaron precultivos de *G. frateurii* y *G. oxydans* en medio de crecimiento con glucosa y se dejaron crecer 16 horas a 30 °C y 210 rpm. Con estos se inoculó un matraz de 1 L conteniendo 250 mL de medio de crecimiento con glicerol puro. Se dejó crecer los cultivos a 30 °C y 210 rpm hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}}$ de 1, transcurrido ese tiempo se detuvo el crecimiento. Posteriormente se centrifugó el volumen necesario para obtener 1,7 mg de peso seco por 15 minutos a 5.000 rpm. El *pellet* bacteriano fue lavado para remover el medio de crecimiento con *buffer* fosfato de lavado 30 mM y fue posteriormente centrifugado a 5.000 rpm por 15 minutos, descartando el sobrenadante.

Las conversiones de glicerol crudo de calidad *splitting* por *resting cells* de *G. frateurii* y *G. oxydans* se llevaron a cabo en matraces de 250 mL con un volumen de 30 mL de medio de reacción suplementado con glicerol *splitting* (glicerol crudo 62,5 g/L, para una concentración de 50 g/L de glicerol, KH_2PO_4 0,9 g/L, K_2HPO_4 0,1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L) a pH 8 para *G. frateurii* y pH 6 para *G. oxydans*, inoculado con los 1,7 mg de peso seco obtenidos previamente. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C y 210 rpm durante 50 horas, por duplicado. Se tomaron muestras de 1 mL a las 3, 6, 20, 26 y 50 horas de reacción. Las muestras fueron centrifugadas a 15.000 rpm por 30 minutos para eliminar el *pellet* bacteriano y el sobrenadante fue filtrado con un filtro de 0,22 μm tratado con polivinilpirrolidona (PVP) y disuelto al quinto en agua mQ para su análisis por HPLC. Paralelamente, se midió el pH del medio de reacción a partir del sobrenadante de las muestras obtenidas.

3.2.6.1. Reusos de *resting cells* para la conversión de glicerol

Se realizaron precultivos de *G. frateurii* y *G. oxydans* en medio de crecimiento con glucosa y se dejaron crecer 16 horas a 30 °C y 210 rpm. Con estos se inoculó un matraz de 1 L conteniendo 250 mL de medio de crecimiento con glicerol puro. Se dejó crecer los cultivos a 30 °C y 210 rpm hasta alcanzar una DO_{600 nm} de 1, transcurrido ese tiempo se detuvo el crecimiento. Posteriormente se centrifugó el volumen necesario para obtener 1,7 mg de peso seco por 15 minutos a 5.000 rpm. El *pellet* bacteriano fue lavado para remover el medio de crecimiento con *buffer* fosfato de lavado 30 mM y fue posteriormente centrifugado a 5.000 rpm por 15 minutos, descartando el sobrenadante.

Se realizaron tres reacciones consecutivas de conversión de glicerol *splitting* reutilizando los 1,7 mg de células obtenidos previamente para cada una de las cepas. Cada reacción de conversión se llevó a cabo en matraces de 250 mL con un volumen de 30 mL de medio de reacción suplementado con glicerol *splitting* a pH 8 para *G. frateurii* y pH 6 para *G. oxydans*. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C y 210 rpm durante 20 horas, por duplicado. Previo a cada reuso, las células fueron centrifugadas a 5.000 rpm por 15 minutos y lavadas con *buffer* fosfato de lavado 30 mM antes de volver a ser resuspendidas en el medio de reacción. Entre el uso 2 y 3 las células fueron almacenadas a 4 °C por 48 horas. Al final de cada uso se colectaron muestras que fueron filtradas con un filtro de 0,22 µm tratado con PVP y disuelto al quinto en agua mQ para su análisis por HPLC.

3.2.7. Análisis por HPLC

La producción de GA y DHA durante las reacciones de conversión fue analizada por HPLC con un equipo Waters (Massachusetts, EEUU), con detector de arreglo de diodos. Se utilizó una columna de intercambio iónico Rezex RHM-Monosaccharide H⁺ (8%) con una precolumna con cartucho Carbo-H 4 x 3.0 mm, ambas obtenidas de Phenomenex (California, EEUU). La fase móvil utilizada fue ácido sulfúrico 3 mM. La detección se llevó a cabo a 60 °C y 210 nm con un flujo de 0,5 mL/min por 21 minutos.

Cada inyección fue de un volumen de 20 μ L. Se construyeron curvas de calibración para GA y DHA con soluciones de 0,15, 0,3, 0,6, 1,25, 2,5 y 5 g/L. Las curvas de calibración y su análisis por HPLC se encuentran disponibles en la sección 8.2 de anexos. Las muestras fueron analizadas por el programa *Empower Pro* de Waters.

4. Resultados y discusión

4.1. Obtención de *stock* bacteriano y observación del crecimiento en placa

Con el fin de obtener un *stock* bacteriano de las tres cepas en estudio (*G. frateurii*, *G. oxydans* y *Gluconobacter sp*), se abrieron las ampollas bajo esterilidad y se resuspendió el liofilizado contenido en cada una de ellas, en medio de recuperación líquido. Posteriormente se dejó crecer en agitación. A su vez, a partir de la suspensión bacteriana obtenida, se tomó una alícuota de la misma y se colocó en una placa de medio de recuperación sólido para luego esparcirlo con un rastrillo estéril. Posteriormente se generaron *stocks* a partir de los cultivos líquidos con glicerol al 30% y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A las 24 horas ya se pudo observar el crecimiento de *G. frateurii* en el medio de recuperación tanto sólido como líquido. Pasadas las 48 horas se pudo observar crecimiento en ambos medios para todas las cepas.

En la Figura 2 se observan estrías realizadas en medio sólido de crecimiento con glucosa a partir de las anteriormente mencionadas presentando colonias típicas de *G. frateurii*, *G. oxydans* y *Gluconobacter sp*. Las mismas fueron crecidas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas y luego fueron almacenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

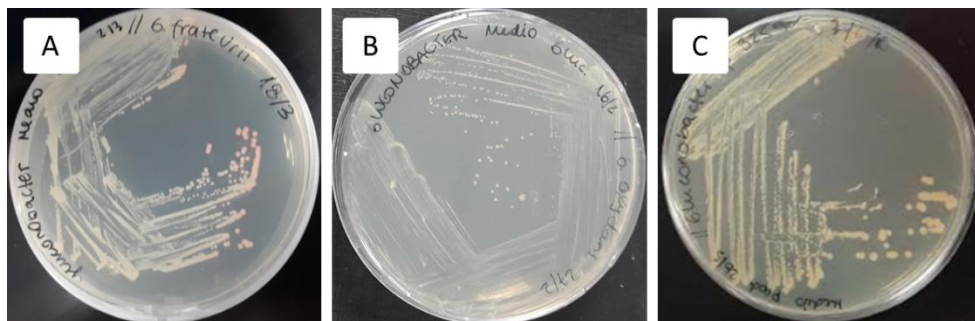


Figura 2: Crecimiento en placa de las cepas en estudio luego de 48 horas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio de crecimiento con glucosa. A) *G. frateurii*, B) *G. oxydans*, C) *Gluconobacter sp*.

Para el caso de *G. frateurii* las mismas son pequeñas, circulares, de color amarillo blanzuzco, algo translúcido y presentan cierta elevación. En algunas colonias se observa la

producción de un pigmento rosa (Fig. 2A). Está reportado que algunas cepas de *Gluconobacter* producen este tipo de pigmentos (24). Las colonias de *G. oxydans* se observan más pequeñas en comparación con las de *G. frateurii*, son de forma redondeada, con cierta elevación y de color amarillo blancuzco. Esta diferencia de tamaño podría indicar que crecen más lento. No se observó producción de pigmentos por parte de las mismas (Fig. 2B). Las colonias de *Gluconobacter sp* guardan cierta similitud con las de *G. frateurii*, siendo también circulares y de color amarillo blancuzco con elevación, presentan además un pigmento rosa (Fig. 2C). Cabe destacar que la aparición del pigmento rosa ocurre en ambos casos luego de someter las colonias a bajas temperaturas (4 °C) durante varios días.

Se obtuvieron por lo tanto *stocks* de todas las cepas en estudio, se pudo estudiar la morfología de las colonias de las mismas, permitiendo encontrar diferencias que facilitan su identificación, como ser la presencia del pigmento color rosa, presente en algunas colonias de *G. frateurii* y *Gluconobacter sp*.

4.2. Identificación bioquímica de las cepas

Las pruebas bioquímicas son una herramienta ampliamente utilizada en la microbiología para el chequeo y la identificación de bacterias. Estas últimas tienen una gran cantidad de propiedades que les son inherentes, utilizándolas es posible entonces diferenciarlas, detectar su presencia o ausencia o conocer detalles sobre la estructura de su membrana, entre otros (25).

Para poder identificar las cepas en estudio, se procedió a realizar una tinción de Gram de las mismas para su posterior observación al microscopio. Con el mismo fin, se realizaron pruebas bioquímicas clásicas para determinar ciertas características de las cepas, estas fueron la prueba de la catalasa y la prueba de la oxidasa. Se buscó además determinar el metabolismo oxidativo-fermentativo de la glucosa a través del crecimiento de las cepas en medio OF. Finalmente, se determinó la capacidad de las mismas de producir ácido a partir de glicerol a través del crecimiento de las mismas en placas de medio de crecimiento suplementado con glicerol.

4.2.1. Tinción de Gram

Se realizó una tinción de Gram sobre las bacterias *G. oxydans*, *G. frateurii* y *Gluconobacter sp* para obtener información sobre la estructura de su pared celular. Esta característica está íntimamente relacionada a la envoltura celular, ya que las bacterias Gram negativas presentan doble membrana lipídica (una externa y otra interna) y en el medio de estas una fina pared celular formada por peptidoglicano. Estas características impiden que la bacteria retenga el colorante cristal violeta, a diferencia de las bacterias Gram positivas que poseen una sola membrana lipídica y una pared gruesa de peptidoglicano.

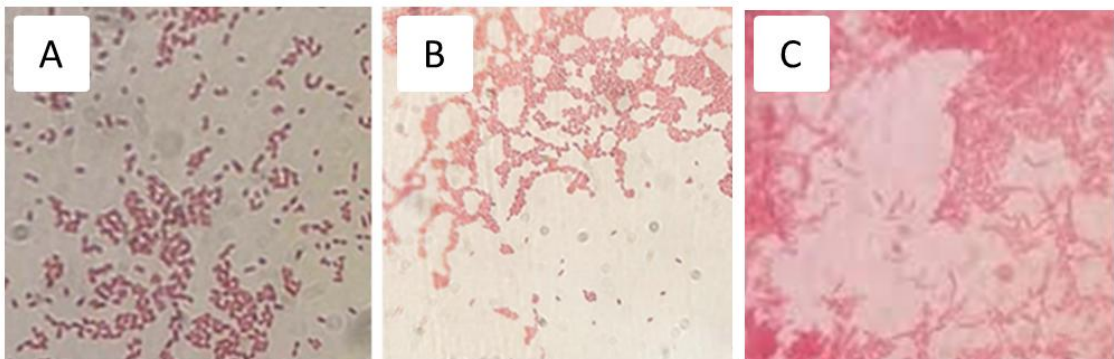


Figura 3: Tinción de Gram de las cepas de *Gluconobacter* en estudio en microscopio óptico con un objetivo de 100X. A) *G. oxydans*, B) *G. frateurii*, C) *Gluconobacter sp*.

Se corroboró que las especies de *Gluconobacter* en estudio son bacterias Gram negativas con forma de bacilo, ya que su tinción resultó de color rosa (Fig. 3). Estos resultados conciden con los reportados en bibliografía (16).

4.2.2. Prueba de la catalasa

Esta prueba fue realizada para determinar si las bacterias *G. oxydans*, *G. frateurii* y *Gluconobacter sp* poseen la enzima catalasa, característica de bacterias aerobias. En este ensayo se utiliza como reactivo el peróxido de hidrógeno, un compuesto muy tóxico para las bacterias aerobias estrictas y anaerobias facultativas. El mecanismo que estas tienen para eliminarlo es a través de la enzima catalasa, que degrada el peróxido de

hidrógeno en agua y oxígeno. En este ensayo, una prueba de catalasa positiva se da cuando se observan burbujas de oxígeno donde se colocó la bacteria, indicando que hay presencia de la enzima catalasa. Está reportado que las especies de *Gluconobacter* son aerobias estrictas, por lo que se espera un resultado positivo de la prueba (16,24).

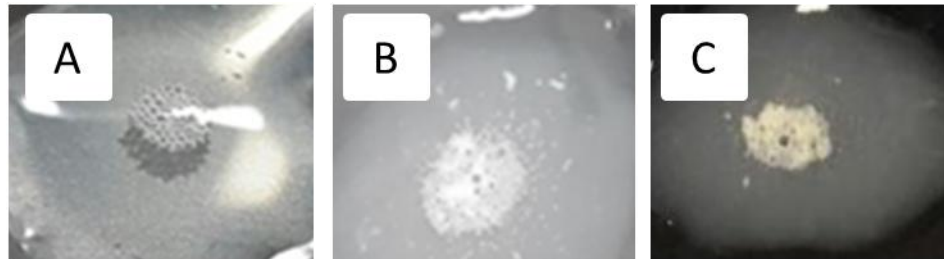


Figura 4: Prueba de la catalasa. A) *G. oxydans*, B) *G. frateurii*, C) *Gluconobacter* sp.

Como se puede observar en la Figura 4, la prueba arroja resultados positivos para las tres especies de *Gluconobacter*, indicando que poseen la enzima catalasa y por ende son bacterias aerobias.

4.2.3. Prueba de la oxidasa

Esta prueba se realizó con el fin de determinar si las bacterias en estudio poseen la enzima citocromo C oxidasa. Durante la respiración aerobia existe una secuencia de enzimas y transportadores que trasladan los electrones desde sus sustratos hasta llegar al citocromo C. La enzima llamada citocromo C oxidasa le quita electrones al citocromo C y estos son posteriormente transferidos por la enzima al oxígeno, siendo este el último aceptor de electrones en la cadena respiratoria. En esta técnica se utiliza el colorante cromógeno TMFD que actúa como donante artificial de electrones para la enzima. Cuando la enzima citocromo C oxidasa oxida al TMFD se observa un color azul. Por lo tanto, las bacterias oxidasa positivas poseen la enzima citocromo C oxidasa y al llevar a cabo la prueba se ve color azul en el papel de filtro. Este es el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizada en este caso como control positivo (Fig. 5 E). Las bacterias que no poseen citocromo C oxidasa, no generan color, como es el caso del control negativo, correspondiente a *E. coli* (Fig. 5 D). Se espera que las bacterias del género *Gluconobacter* arrojen un resultado negativo para esta prueba (24).

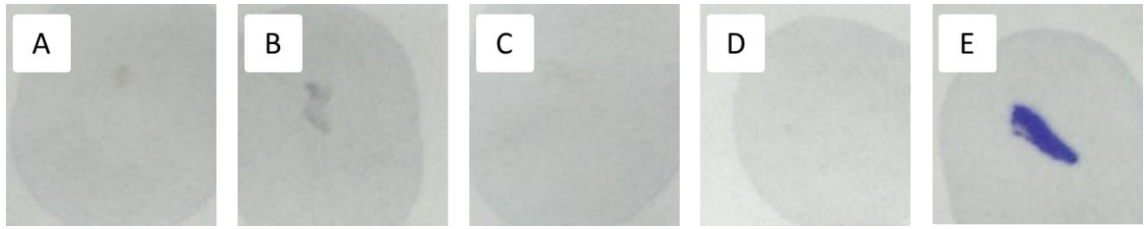


Figura 5: Prueba de la oxidasa. A) *G. oxydans*, B) *G. frateurii*, C) *Gluconobacter sp.*, D) *E. coli* (control negativo), E) *P. aeruginosa* (Control positivo).

Los resultados indican que las tres especies de *Gluconobacter* se valen de una enzima diferente de la citocromo C oxidasa para el transporte de electrones hacia el oxígeno durante la respiración, ya que no presentan coloración azul (Fig. 5).

4.2.4. Crecimiento en medio OF

Este ensayo se llevó a cabo con el fin de determinar el metabolismo oxidativo-fermentativo de las cepas *G. frateurii*, *G. oxydans* y *Gluconobacter sp* en estudio. El metabolismo oxidativo de la glucosa produce ácidos débiles, esto provoca un cambio en el pH y un consecuente viraje de color del azul de bromotimol (componente del medio), variando el color del medio de verde a amarillo.

Se inocularon tubos de medio OF con las distintas cepas (*G. oxydans*, *G. frateurii*, *Gluconobacter sp* y *E. coli* DH5 α) y se incubaron semi abiertos durante 48 horas a 30 °C. Se esperan resultados similares para las tres especies de *Gluconobacter*, ya que son aerobias estrictas, presentando coloración amarilla solamente en la superficie del tubo (16,24). Con respecto a *E. coli* DH5 α , se espera obtener una coloración amarilla a lo largo de todo el tubo, ya que el género *Escherichia* se compone de bacterias anaerobias facultativas (24).

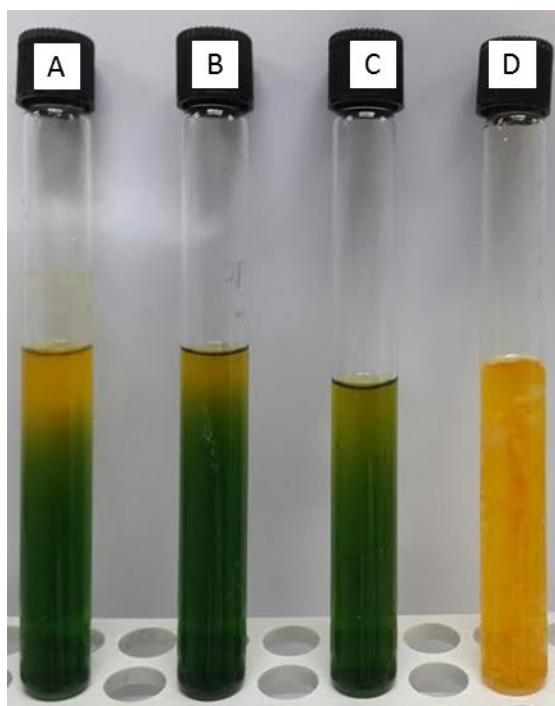


Figura 6: Ensayo de crecimiento en medio OF suplementado con glucosa. A) *G. frateurii*, B) *G. oxydans*, C) *Gluconobacter sp.*, D) *E. coli*.

En las Figuras 6A, 6B y 6C se pueden observar los resultados de *G. frateurii*, *G. oxydans* y *Gluconobacter sp.* La coloración despereja a lo largo del tubo indica que son bacterias aerobias estrictas, ya que solo se observa crecimiento en la superficie del tubo que presenta una coloración amarilla. Esta coloración se debe a la mínima producción de ácido en esa zona, resultante del metabolismo oxidativo de la glucosa que presentan estas tres cepas. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados en bibliografía (16,24). Por otra parte, el control con *E. coli*, presenta una coloración amarilla pareja, lo que indica un crecimiento a lo largo de todo el tubo. Esto indica que es una bacteria anaerobia facultativa, capaz de fermentar la glucosa ya que en el fondo del tubo no hay oxígeno disponible para la oxidación (Fig. 6D).

4.2.5. Crecimiento en medio suplementado con CaCO_3

Para evaluar la posible producción de GA por las cepas en estudio, se inoculó una placa de medio de crecimiento suplementado con CaCO_3 con alícuotas de cultivos de las tres cepas de *Gluconobacter* en estudio junto con una estría apretada de *E. coli*. La aparición de zonas claras alrededor de las colonias indica la solubilización de CaCO_3 debida a la producción de ácidos.

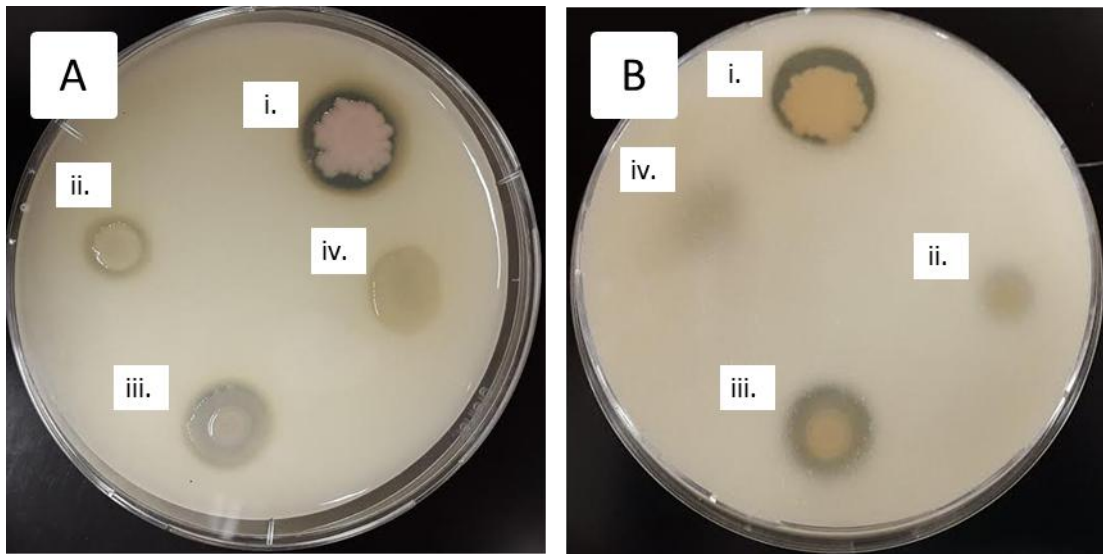


Figura 7: Determinación de la posible producción de GA en placa de medio de crecimiento CaCO_3 . A) Frente de la placa. i. *G. frateurii*, ii. *G. oxydans*, iii. *Gluconobacter sp*, iv. *E. coli* DH5 α (Control negativo). B) Reverso de la placa. i. *G. frateurii*, ii. *G. oxydans*, iii. *Gluconobacter sp*, iv. *E. coli* DH5 α (Control negativo).

Se puede observar que todas las especies de *Gluconobacter* presentan un halo transparente a su alrededor, correspondiente a la solubilización del CaCO_3 , siendo este más notorio para *G. frateurii* (Fig. 7). Los halos presentes alrededor de *Gluconobacter sp* y *G. oxydans* son similares, aunque el correspondiente a *Gluconobacter sp* aparenta tener un diámetro un poco mayor y ser más intenso. Estos resultados indican que las tres cepas producen ácido, dadas las características de las mismas, es probable que la solubilización del CaCO_3 sea particularmente producto de la producción de GA a partir de glicerol. Resultado que fue posteriormente corroborado por HPLC. Por otra parte, la estría apretada *E. coli* (control negativo) no presenta halo alguno. Este resultado concuerda con que *E. coli* no es un organismo productor de ácidos a partir de glicerol.

4.3. Identificación molecular

Dados los comportamientos similares de las cepas en estudio frente a las pruebas bioquímicas planteadas en el apartado 4.2, se buscó desarrollar una técnica molecular que permitiese la identificación de las cepas. En la actualidad, los métodos moleculares independientes de cultivo y del estado fisiológico de las bacterias son ampliamente utilizados en estudios poblacionales dada su alta especificidad (26). Métodos basados en la

amplificación de fragmentos de ADN por PCR utilizando cebadores específicos permiten determinar la presencia de un microorganismo particular en una población heterogénea.

Para el desarrollo de esta técnica se llevó a cabo el alineamiento de los genomas completos de *G. frateurii* (2.158,5 Kb) y *G. oxydans* (1.550,7 Kb) disponibles en la base de datos del NCBI. Dada la gran similitud entre sus secuencias se buscó identificar regiones de poca o nula homología entre las mismas a partir de las cuales se logró diseñar los cebadores específicos para cada cepa. Para el caso de *Gluconobacter sp* no se encuentra disponible la secuencia genómica completa por lo que no se pudo tomar en cuenta a la hora del alineamiento y posterior diseño de cebadores específicos. Se alinearon además las secuencias del gen del ARNr 16S de las tres cepas de *Gluconobacter* en estudio junto con la secuencia análoga correspondiente a *E. coli*. A partir de este alineamiento se diseñaron cebadores específicos para el gen del ARNr 16S, gen presente en todas las bacterias que contiene tanto regiones variables como conservadas (26). Estos últimos cebadores fueron diseñados a partir de una región conservada para su posterior uso como control interno en una reacción de *Multiplex Colony PCR*. Por esta misma razón, durante el diseño de cebadores se buscó que los productos a obtener tuvieran distinto peso molecular, que los cebadores tuvieran similar temperatura de *melting* (T_m) y se descartó la posibilidad de formación de dímeros de cebadores.

En la tabla 2 se muestran las secuencias de los cebadores resultantes del diseño, así como también su T_m y el tamaño del producto de PCR esperado para cada par. Los pares de cebadores específicos se denominan en adelante de la siguiente forma: 16S (amplifican un segmento del gen del ARNr 16S), Frateurii (amplifican un segmento del ADN de *G. frateurii*) y Oxydans (amplifican un segmento el ADN de *G. oxydans*).

Tabla 2: Cebadores diseñados para la identificación molecular de las cepas en estudio.

ADN Molde	Secuencias	T_m (°C)	Tamaño del producto (pb aprox)
ARNr 16S	FWD: 5' CAGCTCGTGTCGTGAGATGT 3' REV: 5' CACTGTCACCGCCATTGTAG 3'	64,8 64,7	189
<i>G. oxydans</i>	FWD: 5' GACGGACCGGAGACTGCTGG 3' REV: 5' AAGCCGCCGATCGTGCTTGG 3'	65,3 65,9	559
<i>G. frateurii</i>	FWD: 5' GCCGCATAGGGTGAGGGTCA 3' REV: 5' CGATGGTGACAGCCGCACAT 3'	64,5 62,3	365

Una vez completado el diseño de cebadores, se procedió a realizar reacciones de PCR para evaluar su funcionamiento. El resultado se observa en la Figura 8.

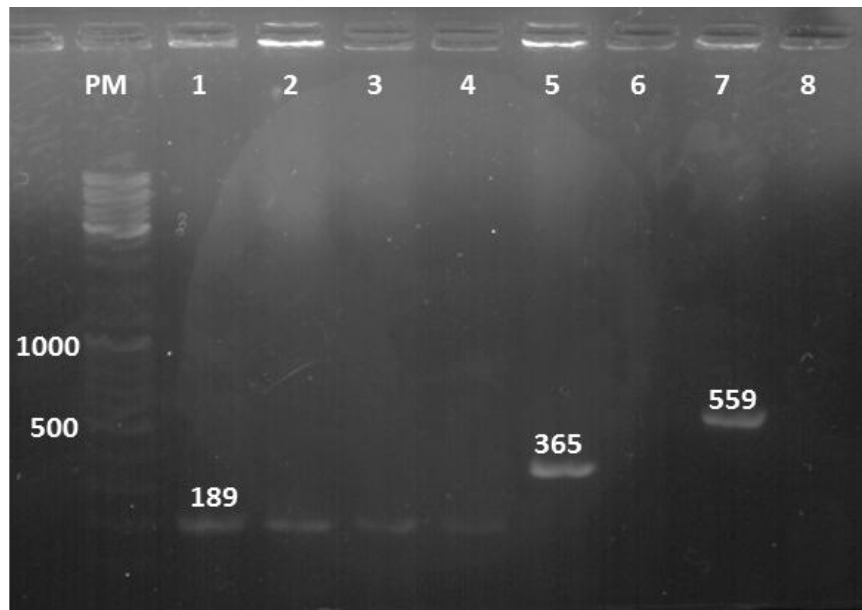


Figura 8: Gel comparativo utilizando los cebadores diseñados. PM- GeneRuler Ladder Mix SM0331; 1- Cebadores: 16S, ADN: *G. frateurii*; 2- Cebadores: 16S, ADN: *G. oxydans*; 3- Cebadores: 16S, ADN: *Gluconobacter sp*; 4- Cebadores: 16S, sin ADN (C-); 5- Cebadores: Frateurii, ADN: *G. frateurii*; 6- Cebadores: Frateurii, sin ADN (C-); 7- Cebadores: Oxydans, ADN: *G. oxydans*; 8- Cebadores: Oxydans, sin ADN (C-).

En los carriles 1 a 4 se puede observar los resultados de la amplificación del fragmento del gen del ARNr 16S bacteriano para las distintas cepas. Se observó amplificación en los carriles 1 a 3 correspondientes a *G. frateurii*, *G. oxydans* y *Gluconobacter sp*, presentando bandas de un peso molecular de 189 pb que condice con el peso esperado. En el carril 4 se muestra el resultado del control negativo que no contenía ADN agregado en la mezcla de reacción, por lo que se esperaba una ausencia de bandas. En el mismo se observó una banda similar a las obtenidas en los carriles 1 a 3. Esta banda puede corresponderse con un error de manipulación al momento del sembrado del gel o bien a la amplificación del ARNr 16S de una bacteria contaminante de la mezcla de reacción, dado que los cebadores amplifican una región conservada de este gen.

Por otro lado, en el carril 5 se muestra el producto de la amplificación del fragmento del genoma de *G. frateurii* a partir de los cebadores diseñados específicamente para esta cepa. Se observó una banda correspondiente a 365 pb que condice con el peso molecular

esperado. En el carril 6 se muestra el control negativo de esta reacción sin ADN agregado, donde no se observaron bandas de acuerdo a lo esperado.

Finalmente, en el carril 7 se observa el resultado de la reacción de amplificación del fragmento de *G. oxydans* a partir de los cebadores diseñados específicamente para esta cepa. La banda obtenida tuvo un peso molecular de 559 pb que condice con el peso esperado para este fragmento. En el carril 8 se observa el control negativo de la reacción sin ADN agregado que no presenta bandas de acuerdo a lo esperado. Los resultados obtenidos para cada par de cebadores diseñados indican un correcto funcionamiento de los mismos.

4.4. Desarrollo de método molecular para identificación y control de contaminación de inóculos

Una vez comprobado el correcto funcionamiento de los cebadores diseñados en las condiciones de reacción seleccionadas, se buscó desarrollar un método molecular de identificación que a su vez pudiese ser utilizado como técnica de control de los inóculos de las reacciones de conversión de glicerol. Para ello se planteó el desarrollo de una reacción de *Multiplex Colony PCR* que emplee los tres juegos de cebadores diseñados y tenga como resultado un patrón de bandas característico para cada cepa.

Se comenzó el desarrollo de la técnica evaluando la reacción de PCR variando la cantidad de juegos de cebadores presentes y utilizando como ADN molde distintas colonias de las cepas de *Gluconobacter* en estudio. A la vez, se probó la técnica en desarrollo con *E. coli* ya que es un posible contaminante de las reacciones de conversión de glicerol en nuestro laboratorio.

Como se observa en la Figura 9, para el caso de *G. oxydans* los cebadores funcionaron correctamente ya que se ve producto amplificado en todos los casos, excepto en el carril 4, lo que es de esperarse ya que se trata del control negativo.

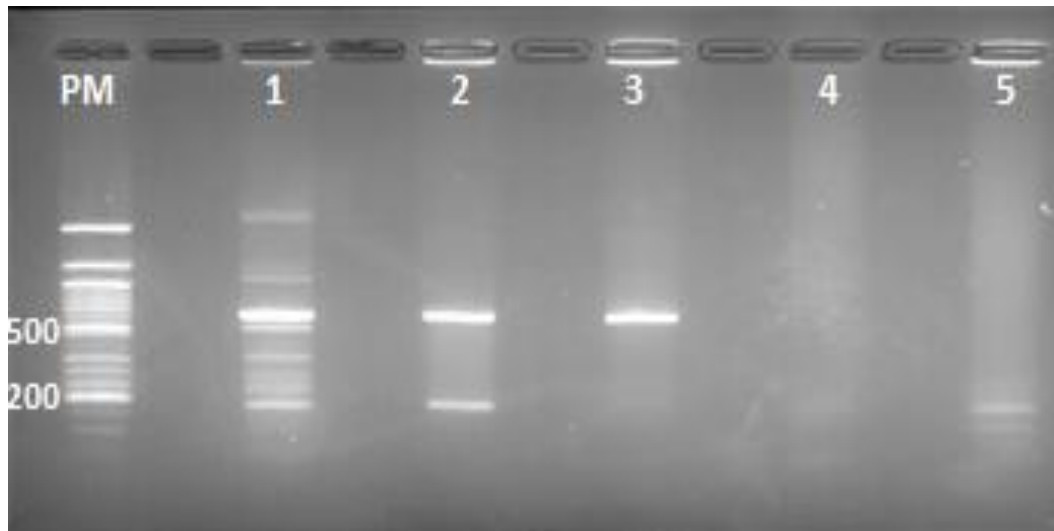


Figura 9: Gel de electroforesis de *G. oxydans*. PM- *Quick-Load 50 bp* 1- Cebadores: Oxydans y Frateurii, ADN: *G. oxydans*, 2-Cebadores: Oxydans, Frateurii, 16S, ADN: *G. oxydans*, 3- Cebadores: Oxydans, ADN: *G. oxydans* (C+), 4- Cebadores: Oxydans, Frateurii, 16S, ADN: Ninguno (C-), 5- Cebadores: Oxydans, Frateurii, 16S, ADN: *E. coli*.

En el carril 1 predomina una banda de aproximadamente 559 pb, esta banda puede ser adjudicada al producto de los cebadores específicos para *G. oxydans*. Se pueden observar además bandas más tenues que pueden ser producto de uniones inespecíficas y combinaciones de los cebadores específicos para *G. oxydans* y *G. frateurii*. En el carril 2 se visualiza la reacción *Multiplex* donde se observa el patrón característico para *G. oxydans* al ser sometido su ADN a los tres pares de cebadores diseñados. En él se puede observar además de la banda de 559 pb, una banda de 189 pb correspondiente a la amplificación del gen del ARNr 16S. En el carril 3 se muestra la reacción llevada a cabo con un solo par de cebadores, donde se observa claramente la banda característica de *G. oxydans*. Con respecto al carril 5, no es posible distinguir claramente una posible contaminación del cultivo con *E. coli* ya que la reacción genera una banda de un peso correspondiente al segmento del gen del ARNr 16S. Sin embargo, el producto parece ser de menor tamaño que el que se obtiene a partir del gen del ARNr 16S de las especies de *Gluconobacter*.

Se repitió el procedimiento antes mencionado utilizando *G. frateurii* como ADN molde. En la Figura 10 se pueden visualizar los resultados obtenidos.

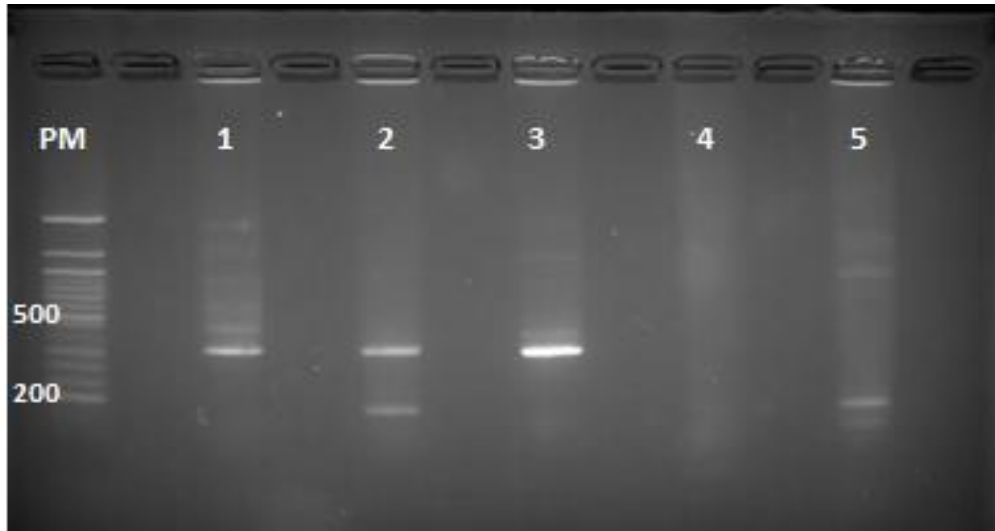


Figura 10: Gel de electroforesis de *G. frateurii*. PM- *Quick-Load* 50 bp, 1- Cebadores: Oxydans y Frateurii, ADN: *G. frateurii*, 2-Cebadores: Oxydans, Frateurii, 16S, ADN: *G. frateurii*, 3- Cebadores: Frateurii, ADN: *G. frateurii* (C+), 4- Cebadores: Oxydans, Frateurii, 16S, ADN: Ninguno (C-), 5- Cebadores: Oxydans, Frateurii, 16S, ADN: *E. coli*.

En el carril 1 se logra observar la banda correspondiente al producto de los cebadores específicos para *G. frateurii* con un peso de 365 pb. Al igual que en el caso anterior, cuando una misma reacción contiene tanto los cebadores específicos para *G. frateurii* como los cebadores específicos para *G. oxydans* se pueden observar bandas inespecíficas. En el carril 2 se presenta el resultado de la reacción *Multiplex*. Además de estar presente la banda específica para *G. frateurii* también es posible ver la banda de 189 pb correspondiente al gen del ARNr 16S. Nuevamente la presencia de los tres pares de cebadores aumenta aparentemente la especificidad de la reacción. En el carril 4 no se observa ninguna banda ya que se trata del control negativo. En el carril 5 se observan bandas de distintas intensidades que podrían utilizarse como guía a tener en cuenta frente a una posible contaminación con *E. coli*.

Teniendo en cuenta que aún no se encuentra secuenciado el genoma de *Gluconobacter sp*, no fue posible el diseño de cebadores específicos para este microorganismo. De todas formas, se probaron los pares de cebadores específicos diseñados para *G. frateurii* y *G. oxydans* en diferentes condiciones utilizando como molde el ADN de *Gluconobacter sp* con la finalidad de observar los productos de PCR que se forman.

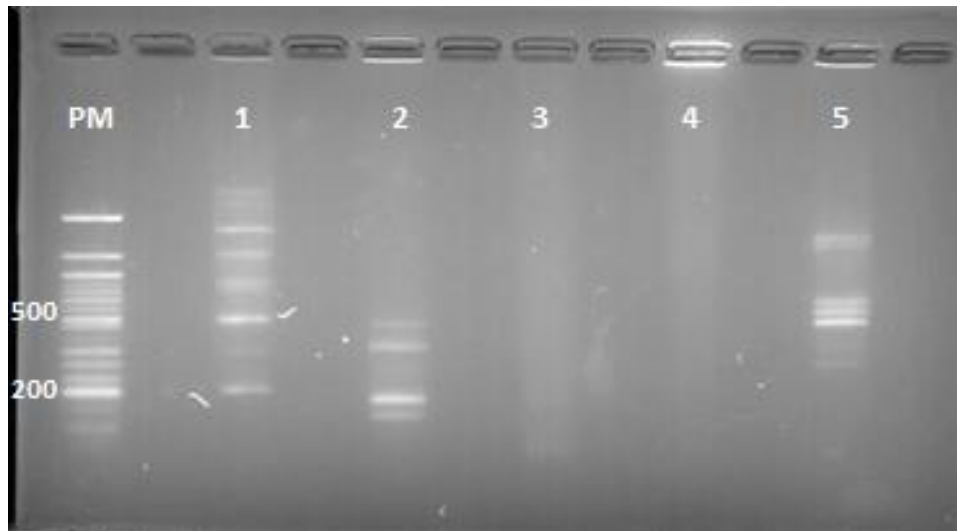


Figura 11: Gel de electroforesis de *Gluconobacter sp.* PM- *Quick-Load 50 bp*, 1- Cebadores: *Fratureii*, ADN: *Gluconobacter sp.*, 2- Cebadores: *Oxydans*, *Fratureii*, 16S, ADN: *Gluconobacter sp.*, 3- Cebadores: *Oxydans*, *Fratureii*, 16S, ADN: Ninguno (C-), 4- Cebadores: *Oxydans*, *Fratureii*, 16S, ADN: *E. coli*, 5- Cebadores: *Oxydans*, ADN: *Gluconobacter sp.*

Como se puede observar en la Figura 11, en el carril 1 aparecen múltiples bandas, esto puede deberse a que la presencia de un solo par de cebadores (en este caso, los específicos para *G. fratureii*) genere un número considerable de interacciones inespecíficas. Lo mismo ocurre en el carril 5 con los cebadores específicos para *G. oxydans*.

En el carril 2 se puede observar el resultado de la reacción *Multiplex*, el mismo es un patrón de bandas particular y específico para esta cepa. Por otra parte, el control negativo presentó el resultado esperado ya que el carril 3 se presenta sin bandas. En el carril 4 sin embargo, no se observan bandas correspondientes a la presencia de *E. coli*, esto pudo deberse a que la colonia utilizada como molde fuera escasa.

Estos ensayos permitieron determinar patrones de bandas característicos para cada una de las cepas que permiten diferenciarlas entre sí con facilidad (Fig. 12).

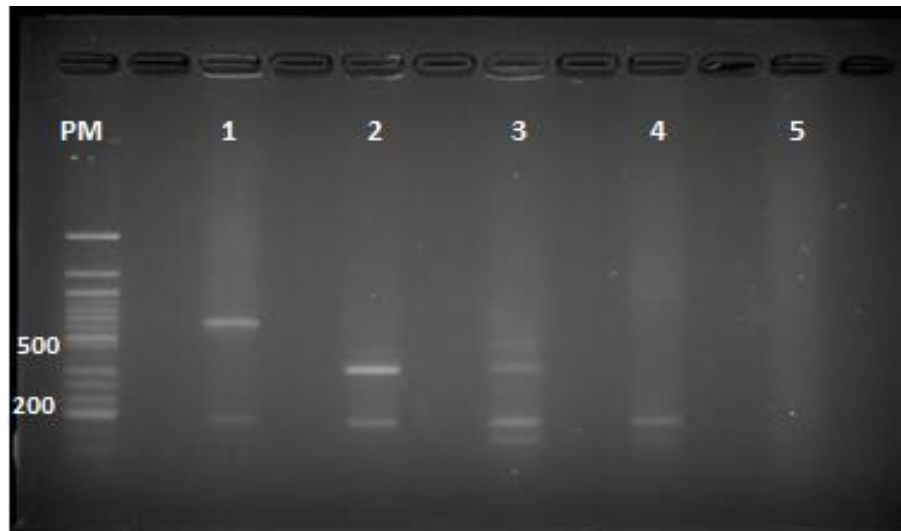


Figura 12: Gel de PCR Comparativa. PM- *Quick-Load 50 bp*, 1- Cebadores: Oxydans, Frateurii, 16S, ADN: *G. oxydans*, 2- Cebadores: Oxydans, Frateurii, 16S, ADN: *G. frateurii*, 3- Cebadores: Oxydans, Frateurii, 16S, ADN: *Gluconobacter sp* 4- Cebadores: Oxydans, Frateurii, 16S, ADN: *E. coli*, 5- Cebadores: Oxydans, Frateurii, 16S, ADN: Ninguno (C-).

Una vez establecida la capacidad de la técnica para la correcta identificación de las cepas, se evaluó la capacidad de la misma para identificar posibles contaminaciones. Los resultados se observan en la Figura 13.

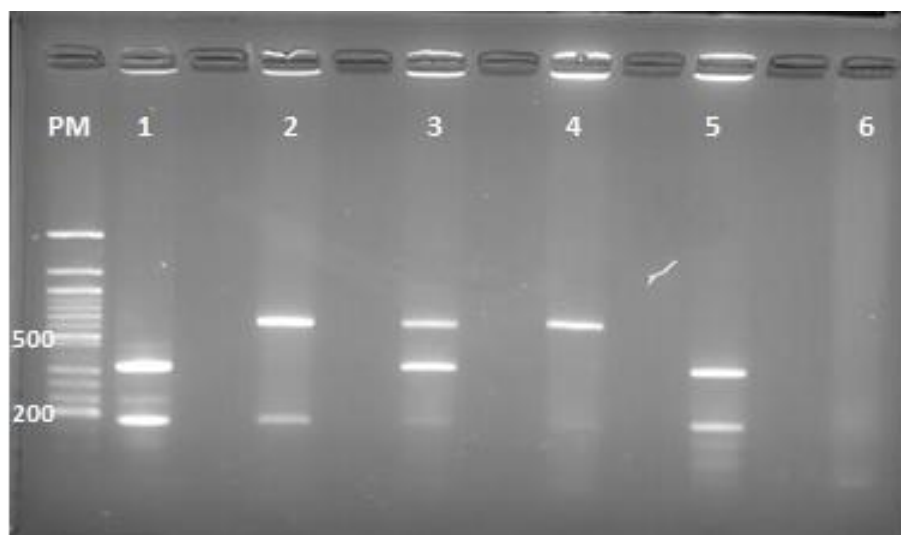


Figura 13: Gel simulacro de contaminación. PM- *Quick-Load 50 bp*, 1- Cebadores: Oxydans, Frateurii, 16S, ADN: *G. frateurii*, 2- Cebadores: Oxydans, Frateurii, 16S, ADN: *G. oxydans*, 3- Cebadores: Oxydans, Frateurii, 16S, ADN: *G. oxydans* y *G. frateurii*, 4- Cebadores: Oxydans, Frateurii, 16S, ADN: *G. oxydans* y *E. coli*, 5- Cebadores: Oxydans, Frateurii, 16S, ADN: *G. frateurii* y *E. coli*, 6- Cebadores: Oxydans, Frateurii, 16S, ADN: Ninguno (C-).

En el carril 1 se puede observar el patrón característico de *G. frateurii*, mientras que en el carril 2 se puede ver el correspondiente a *G. oxydans*. En el carril 3 se simuló una

contaminación entre ambas cepas con el fin de determinar si el método propuesto permite identificar ambos microorganismos en una misma mezcla de reacción. Observando los resultados se puede determinar que esto es así, ya que se observan 3 bandas, una tenue correspondiente al segmento del gen del ARNr 16S, otra a *G. oxydans* (559 pb) y otra a *G. frateurii* (365 pb).

Con respecto a los carriles 4 y 5, donde se simuló una contaminación con *E. coli* para cada una de las cepas con cebadores específicos, esta no generó bandas específicas que permitan evidenciar la presencia del microorganismo. Por lo tanto, podemos concluir que es posible detectar contaminación cruzada entre cultivos de *G. oxydans* y *G. frateurii*, pero esto no es posible con *E. coli*.

Con el fin de validar la técnica de *Multiplex Colony PCR* que fue desarrollada, los productos de PCR generados fueron secuenciados. La identidad de los fragmentos fue corroborada mediante su alineamiento con sus respectivas secuencias teóricas, obtenidas de la base de datos del NCBI (Sección 8.1, anexos).

4.5. Estudios del crecimiento de las cepas

A efectos de este trabajo, se seleccionaron las cepas mutantes de *G. frateurii* y *G. oxydans* para continuar el estudio por su mayor producción de GA y DHA a partir de glicerol crudo (16,27).

Se comenzó estudiando el crecimiento de *G. frateurii* y *G. oxydans* en medio de crecimiento con glucosa con el fin de determinar sus distintas fases de crecimiento. El estudio se llevó a cabo a 30 °C ya que esta temperatura entra dentro del rango de temperatura óptimo para el crecimiento de especies del género *Gluconobacter* y fue reportada en numerosos artículos (2,23,28,29).

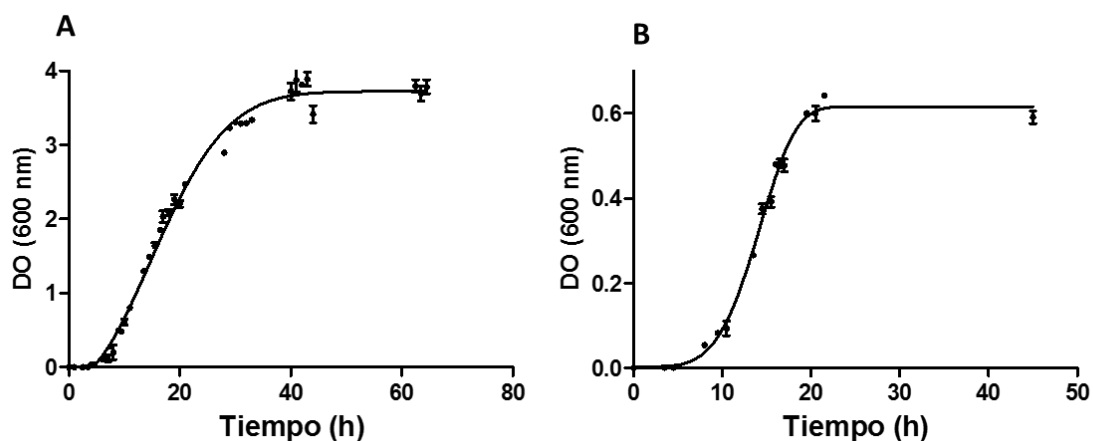


Figura 14: Estudio de crecimiento de *G. frateurii* (A) y *G. oxydans* (B) en medio de crecimiento con glucosa a 30 °C.

Se observó que el crecimiento de *G. frateurii* en este medio es rápido, alcanzando su máximo a las 40 horas. Se pueden observar claramente las distintas etapas del crecimiento microbiano y su duración (Fig. 14 A). En estas condiciones de crecimiento, *G. frateurii* tiene una fase latencia de 8 horas, seguida de una fase exponencial de 25 horas. La fase estacionaria comienza a las 35 horas de crecimiento.

Para el caso de *G. oxydans*, se observó que en las condiciones del experimento la fase de latencia tiene una duración de 8 horas, seguida de una fase exponencial de 10 horas alcanzando el valor máximo de $DO_{600\text{ nm}}$ a las 20 horas de crecimiento, donde comienza su fase estacionaria (Fig. 14 B). Este valor es significativamente más bajo que el obtenido para el caso de *G. frateurii*, ya que con *G. oxydans* en estas condiciones se obtienen valores de $DO_{600\text{ nm}}$ que no superan el 0,7. Es posible que el crecimiento de este microorganismo en medio suplementado con glucosa se vea afectado, ya que el crecimiento en placa del mismo en este medio resulta en colonias pequeñas.

Ensayos preliminares con glicerol puro indicaron que no hubo conversión del mismo utilizando *resting cells* crecidas en medio de crecimiento con glucosa. Posiblemente esto se deba a que no se activa la maquinaria metabólica necesaria para la conversión. Sin embargo, cuando se llevó a cabo el crecimiento en medio con glicerol sustituyendo a la glucosa, se obtuvo conversión para todos los casos. Esto indicó la necesidad del crecimiento del inóculo microbiano en medio suplementado con glicerol. Por esta razón,

se prosiguió con los estudios de crecimiento utilizando medio de crecimiento suplementado con glicerol como fuente de carbono.

Se procedió a crecer ambas cepas de *Gluconobacter* en medio de crecimiento con glicerol a 30 °C (Fig. 15). Se estudió además la correlación entre la $DO_{600\text{ nm}}$ obtenida de la medida con espectrofotómetro y el peso seco (Fig. 16). Esta correlación permitió determinar el volumen de inóculo necesario para las reacciones de conversión de glicerol, ya que asocia las medidas de $DO_{600\text{ nm}}$ con la concentración en g/L de células.

Con respecto al crecimiento de *G. frateurii*, se observa una fase de latencia mayor a la obtenida en el ensayo de crecimiento con medio de crecimiento con glucosa. Esta fase pasó a ser de 18 horas en el medio de crecimiento con glicerol. Es seguida por una fase exponencial con una duración de 15 horas, alcanzando la máxima densidad óptica a las 35 horas de crecimiento.

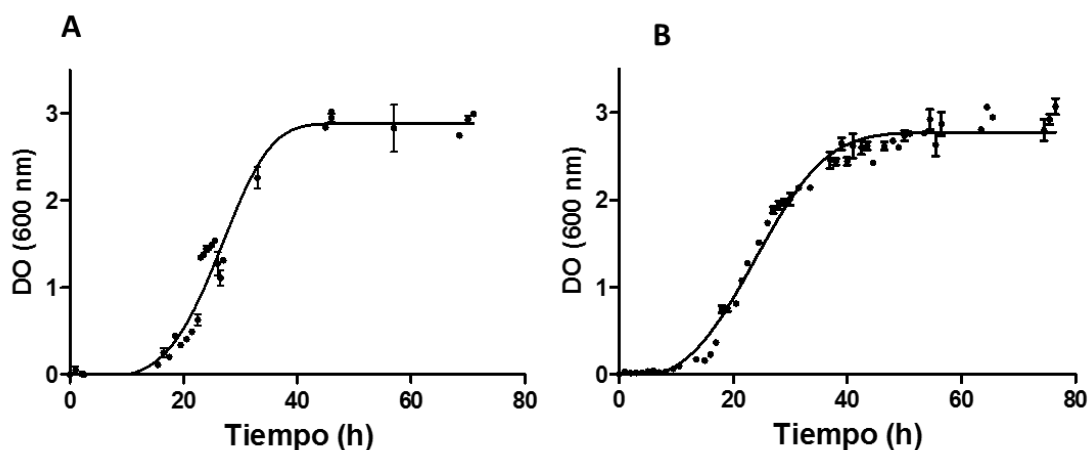


Figura 15: Curvas de crecimiento de *G. frateurii* (A) y *G. oxydans* (B) en medio de crecimiento con glicerol a 30 °C.

Por otra parte, la curva de crecimiento correspondiente a *G. oxydans* presenta una forma similar a la de *G. frateurii* y alcanza $DO_{600\text{ nm}}$ similares. También pueden identificarse correctamente las distintas etapas del crecimiento microbiano, con una fase de latencia de 18 horas, una fase exponencial de 15 horas y una fase estacionaria que comienza a las 35 horas de crecimiento. Comparando estos resultados con los obtenidos previamente para este microorganismo utilizando medio suplementado con glucosa, se observó que la fase

de latencia es más corta en esas condiciones. Sin embargo, al crecer *G. oxydans* en medio suplementado con glicerol se obtienen valores de $DO_{600\text{ nm}}$ significativamente mayores.

Teniendo en cuenta que el crecimiento en medio suplementado con glucosa fue más rápido para las dos cepas, se procedió a utilizar este medio para los precultivos.

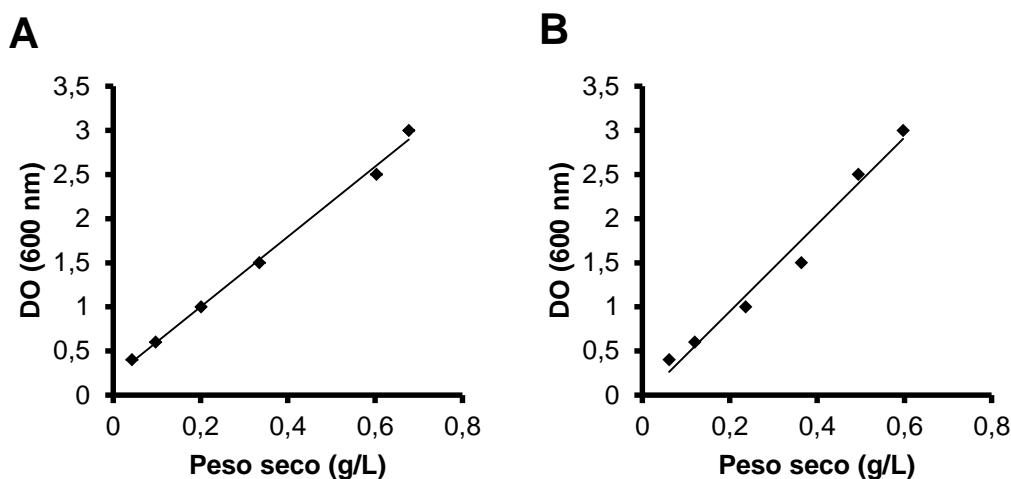


Figura 16: Correlación entre $DO_{600\text{ nm}}$ y peso seco para *G. oxydans* (A), $R^2= 0,99$ y *G. frateurii* (B), $R^2= 0,98$.

La correlación de $DO_{600\text{ nm}}$ y peso seco fue muy similar para ambas bacterias en estudio (Fig. 16). Se logró obtener una correlación lineal en ambos casos que permite determinar el volumen de inóculo necesario para las reacciones de conversión.

4.6. Conversión de glicerol puro a DHA y GA

El objetivo de este trabajo es estudiar la conversión de glicerol a DHA y GA por parte de *G. frateurii* y *G. oxydans* con el fin de revalorizar este sustrato obtenido como subproducto de la producción de biodiesel. Dado que el glicerol crudo obtenido a partir de este proceso contiene un gran número de contaminantes, es importante poner a punto las reacciones de conversión utilizando en primera instancia glicerol puro como sustrato. De esta manera se puede determinar los valores óptimos de ciertos parámetros sin la influencia de estos posibles contaminantes.

4.6.1. Conversión utilizando *resting cells*

4.6.1.1. Conversión en distintos estadios de crecimiento

El metabolismo bacteriano cambia a lo largo de las distintas fases de crecimiento. Durante la fase exponencial se producen los llamados metabolitos primarios, estos compuestos cumplen roles importantes en el crecimiento y la división celular (30). Por el contrario, una vez alcanzada la fase estacionaria, disminuye la producción de metabolitos primarios y comienza la de metabolitos secundarios. Estos son metabolitos que no cumplen ninguna función vital, como antibióticos o toxinas pero resultan de gran importancia en biotecnología (30,31). Es por esta razón que es importante determinar en qué etapa del crecimiento microbiano se produce una mayor cantidad de GA y DHA, dado que es en esa etapa en la que se deben colectar las *resting cells* para las reacciones de conversión.

Se procedió entonces a realizar la conversión de glicerol por *G. frateurii* y *G. oxydans* en distintos estadios de crecimiento. Para el diseño de este ensayo se utilizó como base la curva de crecimiento de ambas cepas crecidas en medio con glicerol a 30 °C (Fig. 15). Se seleccionaron cuatro puntos representativos de las distintas fases del crecimiento bacteriano: fase exponencial temprana ($DO_{600\text{ nm}} = 0,3$), mitad de fase exponencial ($DO_{600\text{ nm}} = 1$), fase exponencial tardía ($DO_{600\text{ nm}} = 2,5$) y fase estacionaria ($DO_{600\text{ nm}} = 3$).

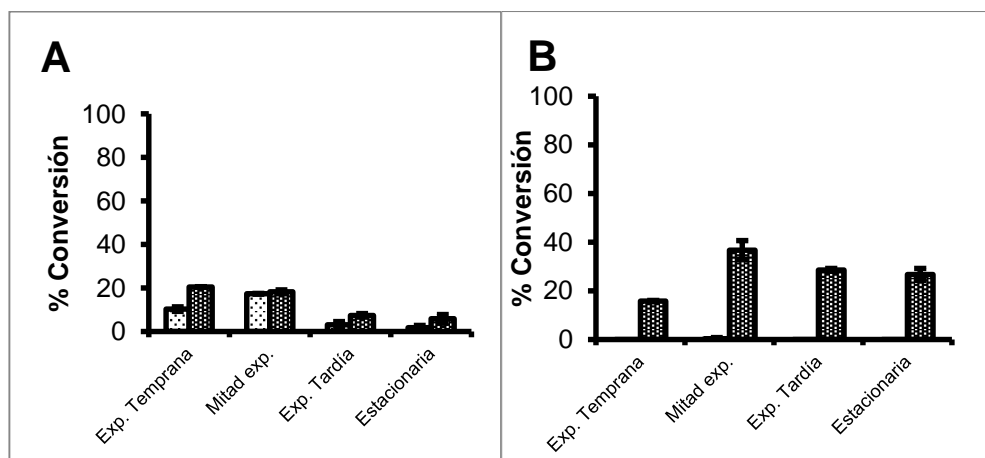


Figura 17: Reacción de 20 horas de conversión de glicerol a GA y DHA por *resting cells* de *G. frateurii* (A) y *G. oxydans* (B) colectadas en las distintas etapas de crecimiento. GA (□), DHA (■).

Se fijó el tiempo de conversión en 20 horas, ya que en este lapso es posible observar diferencias notorias en la producción de GA y DHA. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 17, donde se puede observar que las *resting cells* colectadas durante la mitad de la fase exponencial son las que dieron lugar a un mayor porcentaje de conversión de sustrato a productos. Esto ocurre para ambas cepas en estudio.

En el caso de *G. frateurii* se llega a porcentajes de conversión de $17,4 \pm 0,2\%$ a GA y $18,3 \pm 0,9\%$ a DHA, lo que se traduce en un porcentaje de conversión total de $35,7 \pm 1,1\%$ a los productos estudiados. En el caso de *G. oxydans* se logró un porcentaje de conversión de $36,8 \pm 3,9\%$ de DHA y no se observó conversión significativa para GA ($0,3 \pm 0,5\%$), por lo que la conversión neta de glicerol para ambos microorganismos fue similar en el intervalo de tiempo estudiado.

Estos resultados indican que *G. oxydans* genera más DHA que *G. frateurii* a las 20 horas de reacción, resultado que condice con los reportes previos sobre *G. oxydans*, ya que es una especie ampliamente utilizada en la industria para la producción de dicho compuesto (14). Además, se observó que *G. frateurii* produce ambos compuestos y en comparación con *G. oxydans*, produce más GA. La cepa de *G. frateurii* utilizada en las reacciones de conversión está reportada como una de las mejores productoras de GA por lo que este resultado también es esperable (20).

Una vez determinada la mejor etapa de crecimiento para colectar las *resting cells* se prosiguió a seguir la reacción de conversión a lo largo del tiempo con el fin de determinar en qué momento ocurre la conversión máxima a productos.

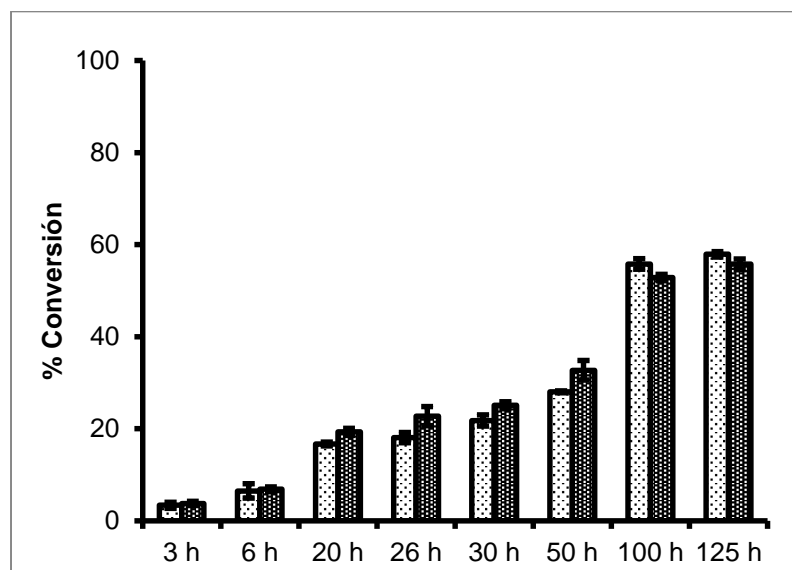


Figura 18: Seguimiento temporal de la conversión de glicerol puro a DHA y GA por resting cells de *G. frateurii*. GA (▨), DHA (▩).

En el caso de *G. frateurii*, se puede observar que a las 100 horas de conversión ya se obtiene más del 99% de conversión a productos, obteniéndose cantidades similares de DHA y GA ($52,9 \pm 0,7\%$ y $55,8 \pm 1,2\%$ respectivamente) (Fig. 18).

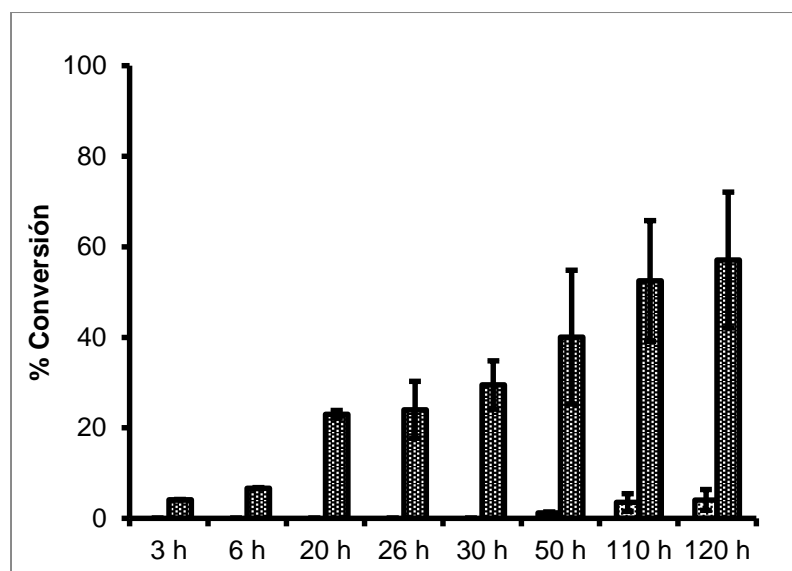


Figura 19: Seguimiento temporal de la conversión de glicerol puro a DHA y GA por resting cells de *G. oxydans*. GA (▨), DHA (▩).

Para el caso de *G. oxydans*, no se alcanzó una conversión total a productos luego de 120 horas de reacción (Fig. 19). Esto puede deberse a una inhibición por producto causada

por una alta concentración de DHA. Se ha reportado que altas concentraciones de DHA inhiben la vía de las pentosas fosfato así como también la enzima glicerol deshidrogenasa, causando daño a la célula (14). Durante el ensayo se logró obtener una conversión máxima del $57,1 \pm 14,9\%$ a DHA y de un $4,1 \pm 2,3\%$ a GA. La producción de GA es detectable recién a partir de las 50 horas de reacción, por lo que para la producción de DHA como único producto sería conveniente detener la reacción a las 30 horas en estas condiciones.

4.6.1.2. Efecto de pH inicial en la conversión de glicerol puro

El pH es un parámetro importante a tener en cuenta ya que afecta directamente la actividad de las enzimas y por consiguiente el crecimiento y metabolismo microbiano (32). Es por esta razón que se pueden obtener distintos rendimientos de conversión dependiendo del pH inicial de la mezcla de reacción.

Con el fin de determinar el pH inicial óptimo, se procedió a realizar conversiones con *resting cells* de *G. frateurii* y *G. oxydans* colectadas en fase exponencial de crecimiento modificando el pH inicial del medio de reacción. Se tomaron muestras a las 50 horas de producción y se analizaron los productos por HPLC.

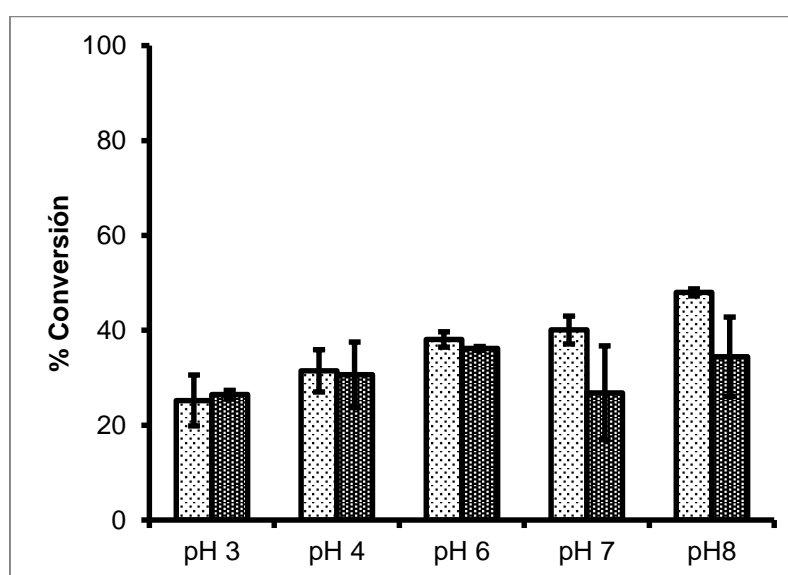


Figura 20: Estudio del efecto del pH inicial del medio de reacción en conversiones utilizando *resting cells* de *G. frateurii*. GA (▨), DHA (▩).

El cambio en el pH inicial del medio de reacción probó ser un factor determinante en la producción de DHA y GA por parte de *G. frateurii* (Fig. 20). La producción de DHA y GA aumenta significativamente con el aumento del pH inicial del medio de reacción, alcanzando casi un 100% de conversión a productos a las 50 horas de producción para un medio de reacción con pH 8 inicial. Con respecto a la producción de DHA se observó que no hay una diferencia significativa entre el pH 7 y pH 8. Dado que *G. frateurii* es una bacteria que se caracteriza por su alta producción de GA, se eligió como óptimo el pH 8 inicial ya que fue donde se obtuvo mayor porcentaje de conversión a este producto.

Luego de determinar el pH inicial óptimo para la reacción, se buscó estudiar la cinética de conversión a productos y la variación del pH del medio de reacción a lo largo del tiempo (Fig. 21).

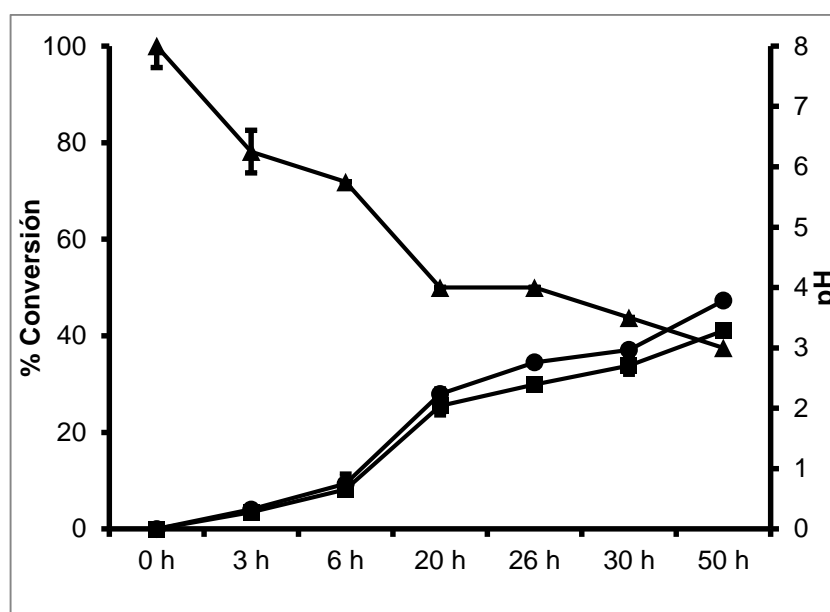


Figura 21: Cinética de producción de DHA y GA por *resting cells* de *G. frateurii* en medio de reacción con pH 8 inicial. pH (▲), DHA (●), GA (■).

La cinética de la reacción muestra que a las 3 horas ya se observa producción tanto de DHA como de GA, la producción de este último se ve reflejada en la baja del pH inicial de la solución de reacción. A lo largo del experimento se observa el aumento en el porcentaje de conversión de GA y DHA alcanzando las 50 horas un $41,1 \pm 1,8\%$ y $47,3 \pm 0,7\%$ respectivamente. La producción se ve acompañada de una baja del pH de la solución de reacción, alcanzando un pH 3 final.

Se repitieron los ensayos anteriormente mencionados para *G. oxydans*. Se procedió a estudiar el pH óptimo para la conversión de glicerol puro a DHA y GA. Se observó que a pH 6 inicial se obtiene un mayor porcentaje de conversión a productos a las 50 horas de reacción (Fig. 22). Para DHA, a pH 6 se produce la mayor conversión a productos ($52,1 \pm 11,7\%$). En todos los casos la producción de GA fue menor al $4,4 \pm 0,9\%$.

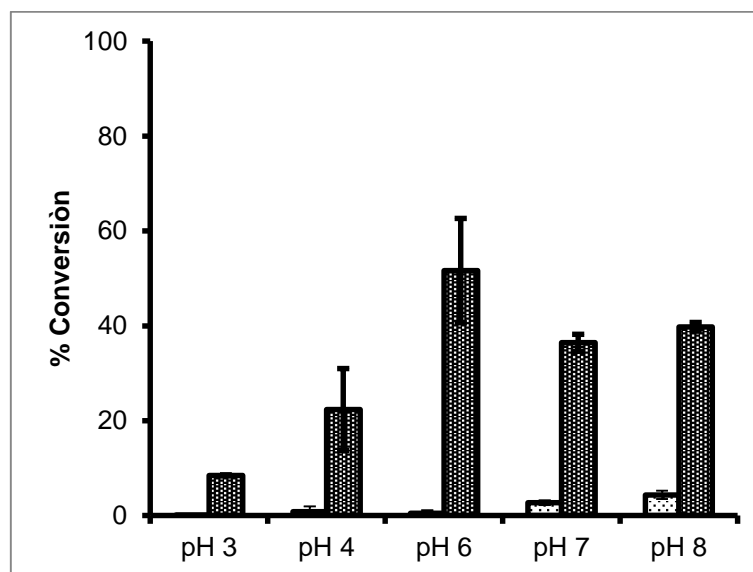


Figura 22: Estudio del efecto del pH inicial del medio de reacción en conversiones utilizando *resting cells* de *G. oxydans*. GA (□), DHA (▨).

Se procedió a seguir la cinética de la reacción a pH 6 durante 50 horas. En este tiempo no se observó producción significativa de GA por parte de *G. oxydans*. Sin embargo, sí se observó producción de DHA, alcanzando un máximo de conversión del $53,6 \pm 13,7\%$ (Fig. 23).

Se observó que el pH del medio de reacción bajó a 4 en las 50 horas en las que transcurrió la reacción. Dado que no se detectó producción de GA en este tiempo, esta baja en el pH probablemente esté asociada a la producción de otros ácidos relacionados con el metabolismo bacteriano.

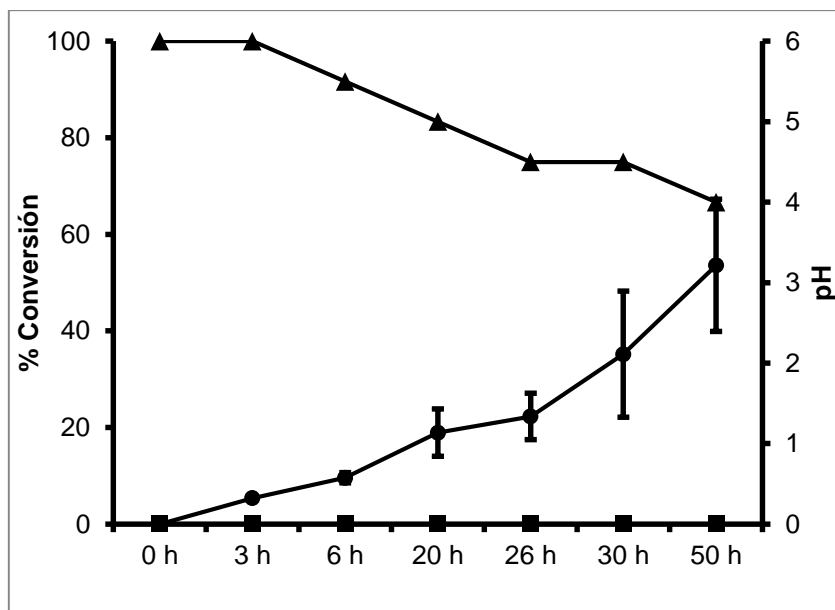


Figura 23: Cinética de producción de DHA y GA por *resting cells* de *G. oxydans* en medio de reacción con pH 6 inicial. pH (▲), DHA (●), GA (■).

4.6.2. Conversión de glicerol puro con células inmovilizadas

Luego de probar las conversiones con *resting cells* de *G. frateurii* y *G. oxydans*, determinando el mejor estadio de crecimiento para colectarlas y el pH óptimo de conversión, se procedió a inmovilizar las mismas en agar. La inmovilización de los microorganismos muchas veces resulta en un aumento de la productividad, a su vez facilita la separación de los catalizadores de la mezcla de reacción y también su consecuente reuso (11,13). Al mejor de nuestro conocimiento no existen reportes previos en la literatura sobre la inmovilización de *G. frateurii* y *G. oxydans* con este sistema de inmovilización.

La metodología de inmovilización seleccionada fue el atrapamiento en perlas de agar. Se prepararon inmovilizados de ambas cepas y se procedió a realizar reacciones de conversión de glicerol puro tomando muestras a las 20 horas de reacción como primera aproximación. Se compararon los rendimientos de conversión obtenidos con los inmovilizados con los resultados previos de las reacciones con *resting cells* (Fig. 24).

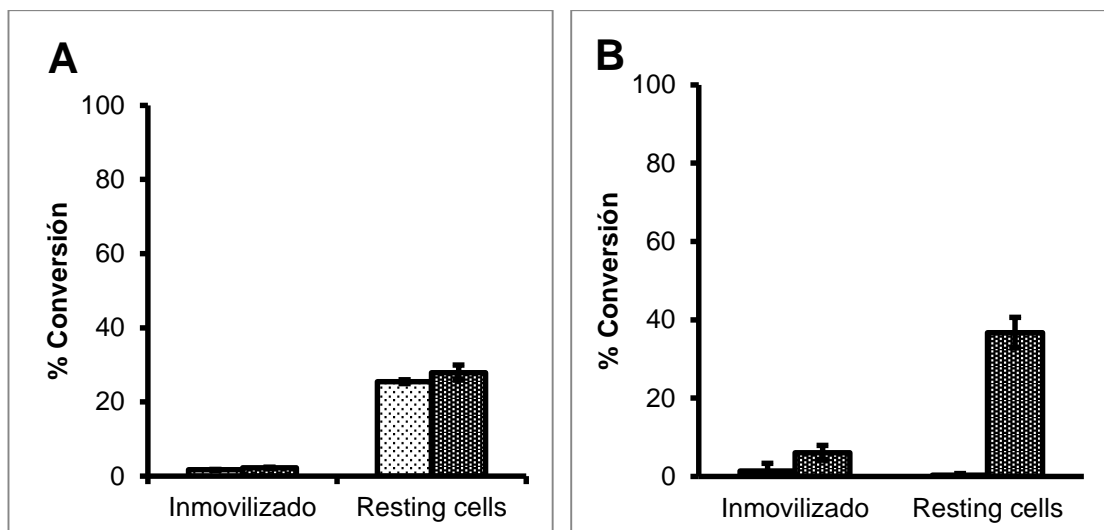


Figura 24: Reacciones de conversión de glicerol puro a DHA y GA por inmovilizados de *G. frateurii* (A) y *G. oxydans* (B). GA (▨), DHA (▩).

Los inmovilizados de *G. frateurii* presentan muy bajos rendimientos, ya que se observa un porcentaje neto de conversión a productos de un $3,9 \pm 0,4\%$, siendo $1,7 \pm 0,2\%$ correspondiente a GA y $2,25 \pm 0,2\%$ a DHA (Fig. 24 A). Contrastando con los resultados obtenidos con las *resting cells*, se observa una notoria diferencia en los rendimientos obtenidos, ya que con esta modalidad se obtiene un porcentaje de conversión neta a productos de $53,4 \pm 2,4\%$, siendo $25,5 \pm 0,5 \%$ de GA y $27,9 \pm 1,9 \%$ de DHA.

Para el caso de los inmovilizados de *G. oxydans*, también se obtuvieron bajos rendimientos de conversión luego de 20 horas en comparación con los obtenidos por las *resting cells* tanto para DHA como para GA (Fig. 24 B). La producción de GA con los inmovilizados alcanzó solamente un $1,4 \pm 1,9\%$, mientras que la producción de DHA a las 20 horas fue de un $6,1 \pm 1,9\%$. Las *resting cells* presentaron en este caso un porcentaje de conversión a GA de $0,32 \pm 0,5\%$ y un porcentaje de conversión a DHA de $36,8 \pm 3,9\%$.

Dado que la productividad de los inmovilizados depende tanto de las características del biocatalizador como de las características de la matriz, la disminución en los rendimientos de conversión puede deberse a la inactivación de las células durante el proceso de inmovilización en agar (13). Esta matriz, como otros termogeles, tiene como desventaja la necesidad de altas temperaturas, usualmente mayores a $85 \text{ }^\circ\text{C}$, para fundirse (11). Otras posibles causas de la disminución de los rendimientos de conversión

pueden ser que exista un problema con la difusión de sustrato y productos a través de la matriz de agar o que las células se encuentren impedidas debido a una alta densidad de las mismas en el interior de la partícula (13). Sin embargo, se pudieron obtener inmovilizados que mantienen la capacidad de conversión de glicerol tanto a GA como a DHA, por lo que es de interés apuntar hacia la optimización de esta u otras técnicas de inmovilización para mejorar los rendimientos de la reacción.

4.7. Conversión de glicerol crudo a DHA y GA

El glicerol crudo de calidad *splitting* resultante de la producción de biodiesel contiene un 80% de glicerol, acompañado de grasas, metanol, cenizas y otros contaminantes en diferentes proporciones. La conversión de glicerol de más baja pureza presenta gran interés biotecnológico ya que agregaría valor al subproducto sin pasar por costosos procesos de purificación.

Se estudió la conversión por *resting cells* de *G. frateurii* y *G. oxydans* utilizando glicerol *splitting* como sustrato con el fin de revalorizar este subproducto. Se utilizaron las mismas condiciones en las reacciones de conversión que las encontradas como óptimas para la transformación de glicerol puro.

Comparando los rendimientos de conversión neta con los distintos sustratos utilizados a las 50 horas de reacción, se observa que para *G. frateurii* la conversión a productos fue superior con glicerol puro, alcanzando un porcentaje de $88,4 \pm 2,4\%$ en comparación con un $25,5 \pm 1,2\%$ obtenido utilizando glicerol *splitting* (Fig. 25 A). Otra diferencia notoria en la producción es el cambio en la relación GA/DHA que se produce a partir de los distintos sustratos. Cuando se utiliza glicerol puro, la relación GA/DHA es mayor que cuando el sustrato es glicerol *splitting*.

En el caso de *G. oxydans*, el rendimiento de conversión a las 50 horas de reacción fue similar para los dos sustratos en estudio. Se obtuvo una conversión de $53,6 \pm 13,7\%$ cuando se empleó como sustrato glicerol puro y $58,1 \pm 2,4\%$ cuando se empleó glicerol *splitting* (Fig. 25 B). Esto indica que, a diferencia de *G. frateurii*, *G. oxydans* mantiene su capacidad de

convertir el glicerol independientemente de la presencia de los contaminantes del glicerol *splitting*.

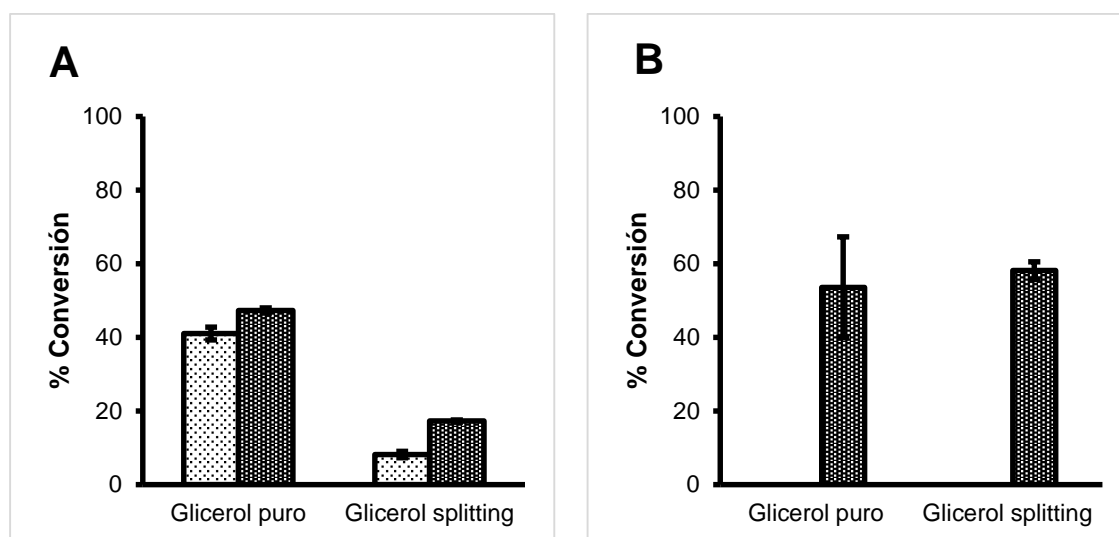


Figura 25: Reacciones de conversión de glicerol a DHA y GA a las 50 horas de reacción por *resting cells* de *G. frateurii* (A) y *G. oxydans* (B) utilizando glicerol puro y *splitting* como sustratos. GA (□), DHA (■).

Se analizó la cinética de las reacciones de conversión junto con la variación del pH del medio. Para el caso de *G. frateurii*, los rendimientos de conversión con glicerol *splitting* como sustrato fueron bajos, alcanzando un $8,2 \pm 0,9\%$ de conversión a GA y un $17,3 \pm 0,3\%$ de conversión a DHA luego de 50 horas de reacción (Fig. 26). La disminución en el pH observada se relaciona con el leve aumento en la concentración de GA, alcanzando un pH 6 a las 50 horas de reacción.

Esta baja productividad de GA puede deberse a la presencia de metanol en la solución de reacción, ya que este tiene efectos inhibitorios sobre la enzima mADH, encargada de la producción del ácido. Sato y colaboradores reportaron una baja en la productividad de GA en presencia de metanol por la misma cepa de *G. frateurii* utilizada en este estudio, que se revierte cuando el mismo es retirado del medio de reacción (17,33).

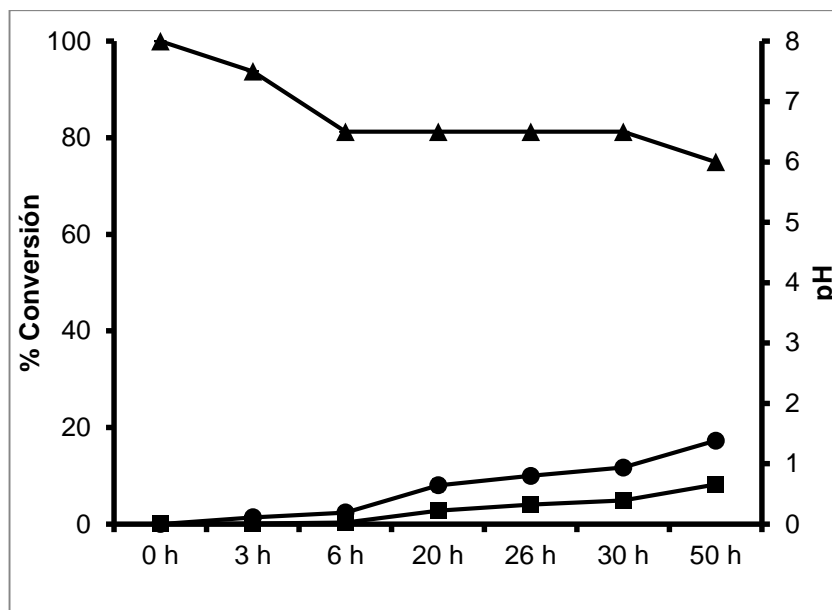


Figura 26: Cinética de producción de DHA y GA por *resting cells* de *G. frateurii* utilizando glicerol *splitting* como sustrato. pH (▲), DHA (●), GA (■).

El seguimiento de la reacción de conversión de glicerol *splitting* por *G. oxydans* muestra una alta producción de DHA por parte del mismo a las 50 horas de reacción, alcanzando un porcentaje de $58,1 \pm 2,4\%$ de conversión a este producto (Fig. 27). El pH del medio de reacción disminuye al inicio, pero a partir de las 20 horas se mantiene constante a lo largo del tiempo, alcanzando un pH 5 al final del ensayo.

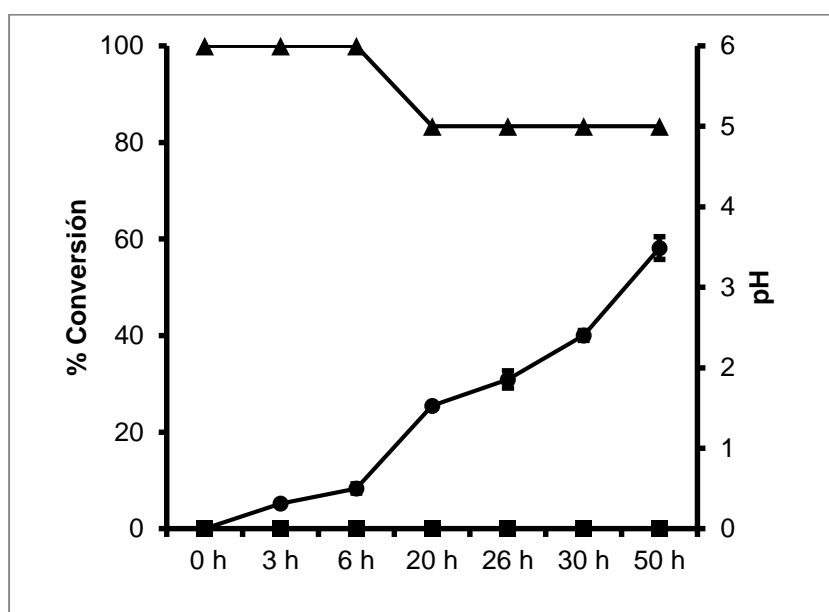


Figura 27: Cinética de producción de DHA y GA por *resting cells* de *G. oxydans* utilizando glicerol *splitting* como sustrato. pH (▲), DHA (●), GA (■).

Los resultados obtenidos para esta cepa son prometedores, ya que como se mencionó con anterioridad, la producción de DHA es similar utilizando como sustrato tanto glicerol *splitting* como glicerol puro (Fig. 25 B). Esto es ventajoso ya que el glicerol *splitting* es un desecho de la industria que supone una materia prima significativamente más económica en comparación con el glicerol puro.

Se evaluó la posibilidad de reutilizar las células a lo largo de una serie de conversiones consecutivas (Fig. 28).

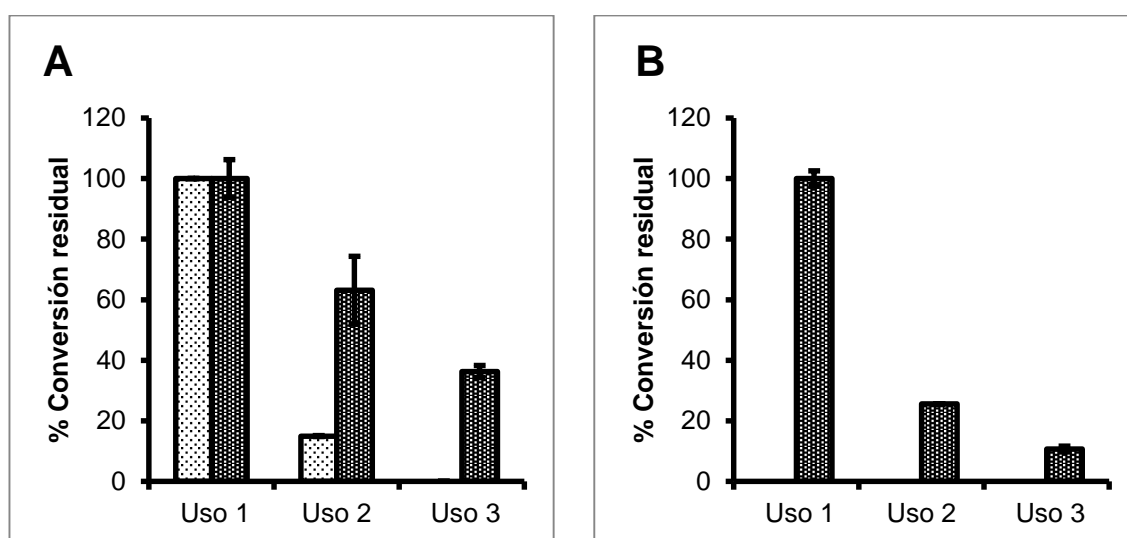


Figura 28: Reacciones de conversión de glicerol crudo a DHA y GA por *resting cells* de *G. frateurii* (A) y *G. oxydans* (B) a 20 horas. GA (▨), DHA (■).

Es posible observar una caída en el rendimiento de conversión a lo largo de los consecuentes reusos. Estos resultados indican que, si bien la capacidad de las células para convertir glicerol a DHA y GA en las condiciones del experimento se mantiene luego del proceso de centrifugación y lavado, la misma disminuye cada vez que se vuelve a utilizar el inóculo bacteriano. Es posible que variando algunas condiciones durante las reacciones de conversión tales como relación de inóculo a volumen final, pH durante el proceso o temperatura, se logren no solo mejores rendimientos en el primer uso sino mayor capacidad de las células para ser reusadas.

5. Análisis económico

Dado que se trabajó a escala de laboratorio, con volúmenes de reacción de 30 mL, a una concentración de 50 g/L de glicerol y con procesos sin optimizar, no se puede realizar un análisis económico profundo. Sin embargo, considerando los precios en el mercado tanto del glicerol puro y crudo, como de los productos obtenidos y los resultados de este trabajo, se puede hacer una estimación sobre la cantidad de veces que se revaloriza un gramo de producto obtenido con respecto al gramo de sustrato.

Se consideran para el análisis los resultados obtenidos a partir de las conversiones de glicerol puro y *splitting* con *resting cells*, ya que fueron las que otorgaron mayores porcentajes de conversión. Se tomaron en consideración los precios de mercado de dos sales de GA de diferentes grados de pureza, siendo estas una resultante de una mezcla racémica de GA (DL-GA) y una sal con pureza enantiomérica (D-GA). Para la DHA también se consideraron los precios de mercado de dos productos con distintos grados de pureza. Estos fueron la DHA de grado cosmético (> 98%), por su gran importancia en la industria y un estándar de DHA de alta pureza que cumple los requerimientos de la Farmacopea Americana (USP). Los datos fueron obtenidos del catálogo de Sigma-Aldrich y fueron adaptados a precios de Uruguay, considerando costos de traslado y tributos aduaneros. Es importante notar que la posible rentabilidad de las revalorizaciones planteadas en este análisis está sujeta a la consideración de costos de escalado y purificación que no pueden ser estimados en esta etapa del trabajo. Cabe destacar además que estos costos de purificación pueden variar de acuerdo al sustrato utilizado para las conversiones, ya que el glicerol *splitting* posee numerosos contaminantes, lo que puede traducirse en un proceso de purificación más costoso.

5.1. Revalorización de glicerol puro

En las etapas iniciales de esta investigación, se utilizó glicerol comercial con un 99,5% de pureza para realizar las conversiones a productos por *G. frateurii* y *G. oxydans*. Los rendimientos de conversión obtenidos para ambas cepas en estas condiciones fueron muy buenos, por lo que es interesante estudiar cuánto se revalorizaría el gramo de glicerol puro con respecto al valor del gramo de los posibles productos. De esta manera, planteamos la

posibilidad de utilizar nuestra metodología como una forma de agregar más valor al gramo de un producto que ya de por sí es valioso en la industria, el glicerol puro.

Para el caso de *G. frateurii*, se obtienen altos rendimientos de conversión para ambos productos (Tabla 3). Este microorganismo es un gran productor de GA, por lo que la conversión de glicerol puro con el mismo revaloriza el gramo de sustrato unas 869 veces obteniendo una mezcla racémica de una sal de GA (DL-GA). Por otra parte, es interesante estudiar el rédito económico de la producción de una sal enantioméricamente pura, ya que está reportado que *G. frateurii* produce D-GA con un exceso enantiomérico del 72% (20). Si bien la separación de enantiómeros requiere de procesos de alto costo, la producción de un gramo de D-GA por *G. frateurii* resultaría en una revalorización del gramo de sustrato en unas 8.169 veces.

Con respecto a la producción de DHA por parte de este microorganismo, si bien se obtuvieron porcentajes de conversión altos, el precio de mercado del gramo de la DHA de grado cosmético es menor al del glicerol puro por lo que no se logra revalorización. De todas formas, se puede considerar a *G. frateurii* como un buen productor de DHA para su utilización como estándar que cumpla con los requerimientos de la USP, revalorizando el gramo de sustrato unas 4.694 veces.

Tabla 3: Revalorización del glicerol puro por *G. frateurii*.

g GA/ g glicerol puro	Precio de mercado (g)			Revalorización del gramo de sustrato	
	Glicerol puro (99,5%)	DL-GA	D-GA	DL-GA	D-GA
0,41	0,4 USD	848 USD	7.970 USD	869 veces	8.169 veces
g DHA/ g glicerol puro	Precio de mercado (g)			Revalorización del gramo de sustrato	
	Glicerol puro (99,5%)	DHA de grado cosmético	DHA estándar USP	DHA de grado cosmético	DHA estándar USP
0,47	0,4 USD	0,151 USD	3.995 USD	No se logra revalorización	4.694 veces

Para el caso de *G. oxydans*, un microorganismo ampliamente utilizado en la industria por su alta producción de DHA, no es viable su utilización para la producción de GA. Los rendimientos de conversión a GA resultaron bajos e incluso indetectables en algunos experimentos, por lo que la revalorización del gramo no es significativa considerando una posible producción de sales de DL-GA y D-GA.

Con respecto a la producción de DHA por parte de *G. oxydans*, la utilización de glicerol puro como sustrato para la producción de DHA de uso cosmético no es rentable (Tabla 4). Como se mencionó con anterioridad, esto se debe a que el precio en el mercado del gramo de la DHA de grado cosmético es menor al del gramo de glicerol puro, por lo que a través de la conversión se estaría perdiendo valor a pesar de obtener un buen rendimiento. Sin embargo, la producción de un estándar de DHA de alta pureza que se ajuste a los requerimientos de la USP podría resultar rentable, ya que el gramo de sustrato se revalorizaría unas 5.293 veces.

Tabla 4: Revalorización del glicerol puro por *G. oxydans*.

g GA/ g glicerol puro	Precio de mercado (g)			Revalorización del gramo de sustrato	
	Glicerol puro (99,5%)	DL-GA	D-GA	DL-GA	D-GA
ND*	0,4 USD	848 USD	7.970 USD	No se logra revalorización	No se logra revalorización
g DHA/ g glicerol puro	Precio de mercado (g)			Revalorización del gramo de sustrato	
	Glicerol puro (99,5%)	DHA de grado cosmético	DHA estándar USP	DHA de grado cosmético	DHA estándar USP
0,53	0,4 USD	0,151 USD	3.995 USD	No se logra revalorización	5.293 veces

*No se detecta producción significativa.

5.2. Revalorización de glicerol *splitting*

En Uruguay, ALUR comercializa el gramo de glicerol crudo a un valor que oscila entre los 0,005 y 0,007 centavos de dólar a países como Dinamarca, Holanda, Alemania y Suecia (34). Luego del proceso de *splitting*, el mismo se comercializa en el ámbito local a un valor aproximado de 0,02 centavos de dólar por gramo. Los ensayos comprendidos dentro de este trabajo fueron realizados utilizando glicerol *splitting*, por lo que se utilizará su precio por gramo para realizar las estimaciones.

La conversión de glicerol *splitting* a GA por *G. frateurii* no presenta altos rendimientos de conversión. Sin embargo, comparando el precio del gramo de glicerol *splitting* en el mercado con los precios del gramo de las sales de GA y considerando los rendimientos de conversión, para los dos posibles productos existe una revalorización significativa del gramo de sustrato (Tabla 5). Considerando una posible producción de una sal de DL-GA, el gramo de sustrato se revalorizaría unas 347.680 veces. Si en cambio se buscara producir una sal con pureza enantiomérica, el gramo se revalorizaría 3.267.700 veces. Se debe tener en cuenta además que el proceso de conversión no ha sido del todo optimizado, por lo que se podría aumentar aún más los rendimientos y esto supondría una revalorización mayor del gramo de sustrato.

Por otra parte, la producción de DHA por *G. frateurii* en estas condiciones tampoco presenta altos rendimientos de conversión. De todas formas, teniendo en cuenta el bajo costo del gramo de glicerol *splitting* en el mercado, la producción de DHA de grado cosmético supondría una revalorización del gramo de glicerol *splitting* de unas 128 veces. La producción de un estándar de DHA supondría una mayor revalorización del gramo de sustrato, obteniendo un aumento en el valor del mismo de 3.395.750 veces.

Tabla 5: Revalorización del glicerol *splitting* por *G. frateurii*.

g GA/ g glicerol <i>splitting</i>	Precio de mercado (g)			Revalorización del gramo de sustrato	
0,082	Glicerol <i>splitting</i> (80%)	DL-GA	D-GA	DL-GA	D-GA
	0,0002 USD	848 USD	7.970 USD	347.680 veces	3.267.700 veces
g DHA/ g glicerol <i>splitting</i>	Precio de mercado (g)			Revalorización del gramo de sustrato	
0,17	Glicerol <i>splitting</i> (80%)	DHA de grado cosmético	DHA estándar USP	DHA de grado cosmético	DHA estándar USP
	0,0002 USD	0,151 USD	3.995 USD	128 veces	3.395.750 veces

Para el caso de *G. oxydans*, no se observó conversión significativa a GA en las 50 horas de reacción utilizando glicerol *splitting* como sustrato, por lo que no es rentable la utilización de este microorganismo para la producción de este ácido en ninguna de sus formas.

Sin embargo, *G. oxydans* presentó un alto porcentaje de conversión a DHA a partir de glicerol *splitting*. Este resultado es sumamente prometedor considerando el precio en el mercado del gramo de glicerol *splitting* en comparación con el gramo de DHA para uso cosmético. Este último es un producto con una alta demanda ya que se utiliza extensivamente en las industrias cosmética, química y farmacéutica (14). La producción de este compuesto a partir de glicerol puro no es rentable, no obstante, cuando se utiliza glicerol *splitting* como sustrato, el gramo se revaloriza unas 438 veces lo que podría volver rentable la producción de este producto. A su vez, la producción de un estándar de DHA que cumpla con los requerimientos de la USP supondría una revalorización del gramo de sustrato mucho mayor, alcanzando un aumento de 11.585.500.

Tabla 6: Revalorización del glicerol *splitting* por *G. oxydans*.

g GA/ g glicerol <i>splitting</i>	Precio de mercado (g)			Revalorización del gramo de sustrato	
ND*	Glicerol <i>splitting</i> (80%)	DL-GA	D-GA	DL-GA	D-GA
	0,0002 USD	848 USD	7.970 USD	No existe revalorización	No existe revalorización
g DHA/ g glicerol <i>splitting</i>	Precio de mercado (g)			Revalorización del gramo de sustrato	
0,58	Glicerol <i>splitting</i> (80%)	DHA de grado cosmético	DHA estándar USP	DHA de grado cosmético	DHA estándar USP
	0,0002 USD	0,151 USD	3.995 USD	438 veces	11.585.500 veces

*No se detecta producción significativa.

6. Conclusiones

En este trabajo se estudió la conversión de glicerol, tanto puro como crudo (80%), a DHA y GA por *resting cells* de especies mutantes del género *Gluconobacter* (*G. frateurii*, *G. oxydans* y *Gluconobacter sp.*).

Se logró desarrollar una técnica molecular para la identificación de las mismas. Se puso a punto una reacción de *Multiplex Colony PCR* con tres juegos de cebadores obteniendo un patrón de bandas característico para cada una de las tres cepas. Este método permitió además identificar contaminación cruzada entre las cepas en estudio, siendo muy valioso para el control de inóculos.

Se estudió el crecimiento de *G. frateurii* y *G. oxydans* en medios de crecimiento suplementados con glucosa o con glicerol. Se observó que el crecimiento en medio de glucosa es más rápido que en medio de glicerol, pero se determinó que este último es necesario en el medio de crecimiento de los inóculos para las reacciones de conversión. Se logró determinar las diferentes etapas del crecimiento microbiano para ambas cepas en ambos medios de crecimiento. Además, se pudo realizar una correlación entre $DO_{600\text{ nm}}$ y concentración celular, fundamental para preparar los inóculos de las reacciones de conversión.

Se llevaron a cabo estudios de conversiones con glicerol puro como sustrato. Se optimizó la fase de crecimiento para coleccionar las *resting cells*, siendo esta la mitad de la fase exponencial de crecimiento para *G. frateurii* y *G. oxydans*. Se determinó el pH óptimo para las reacciones de conversión. Los resultados obtenidos indicaron que el pH óptimo de conversión para *G. frateurii* fue de 8, mientras que para *G. oxydans*, el pH óptimo para la conversión fue de 6.

Para el caso de *G. frateurii* se obtuvo un porcentaje de conversión a GA y DHA de $41,1 \pm 1,7\%$ y $47,3 \pm 0,7\%$ respectivamente. Estos resultados suponen una conversión neta del $88,4 \pm 2,4\%$ del glicerol puro presente en la reacción hacia estos productos. La conversión por parte de *G. oxydans* a GA no fue significativa, sin embargo, se obtuvo un $53,6 \pm 13,7\%$ de conversión a DHA luego de 50 horas de reacción.

Se llevaron a cabo conversiones utilizando glicerol de calidad *splitting* como sustrato. Para el caso de *G. frateurii*, la conversión neta a productos utilizando glicerol *splitting* luego de 50 horas fue significativamente menor a la obtenida utilizando glicerol puro como sustrato. La conversión a GA y DHA fue de $8,2 \pm 0,9\%$ y $17,3 \pm 0,3\%$ respectivamente. *G. oxydans*, por otro lado, no produjo un porcentaje significativo de GA. Sin embargo, la producción a DHA por parte de este microorganismo utilizando glicerol *splitting* como sustrato fue similar a la producción a partir de glicerol puro alcanzando un $58,1 \pm 2,4\%$ de conversión a las 50 horas de reacción. Se demostró que las células en reposo podían ser reutilizadas durante al menos 3 reusos, aunque con menores porcentajes de conversión.

Resultados preliminares de inmovilización de las cepas indicaron que la capacidad de convertir el glicerol a los productos de interés se mantiene luego del proceso de inmovilización. No existen reportes previos de conversión en estas condiciones.

Los resultados obtenidos para *G. frateurii* demuestran su potencial para la revalorización de glicerol, tanto puro como crudo, mediante su conversión a GA. La producción de DHA de grado cosmético por parte de este microorganismo utilizando glicerol puro no genera revalorización, sin embargo, cuando el sustrato es glicerol *splitting*, la producción de DHA de uso cosmético se vuelve posiblemente rentable. Para el caso de *G. oxydans*, la producción de GA no es significativa. Este microorganismo se destaca por su producción de DHA tanto a partir de glicerol crudo como de glicerol *splitting*. Esto lo perfila como un microorganismo a considerar para la producción de DHA de grado cosmético, un reactivo con gran demanda en las industrias química, cosmética y farmacéutica, a partir de glicerol *splitting*.

7. Referencias bibliográficas

1. Ayoub M, Abdullah AZ. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2012;16(5):2671–2686.
2. Habe H, Shimada Y, Yakushi T, Hattori H, Ano Y, Fukuoka T, Kitamoto D, Itagaki M, Watanabe K, Yanagishita H, et al. Microbial production of glyceric acid, an organic acid that can be mass produced from glycerol. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(24):7760–7766.
3. Global Market Insights. Glycerol Market Size By Application (Personal Care, Polyether Polyol Applications, Alkyd Resins), By Source (Biodiesel, Fatty Alcohols, Fatty Acids), Industry Analysis Report, Regional Outlook, Price Trend, Downstream Potential, Competitive Market Share & Forecast, 2012 - 2022 [Internet]. Delaware: Global Market Insights, Inc.; Marzo 2016 [Citado Marzo 2017]. Disponible desde: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/glycerol-market-size>.
4. Quispe CAG, Coronado CJR, Carvalho JA. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2013;27(August 2016):475–493.
5. Yang F, Hanna M a, Sun R. Value-added uses for crude glycerol-a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*. 2012;5(1):13.
6. 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.
7. Bonet J, Costa J, Sire R, Reneaume JM, Pleșu AE, Pleșu V, Bozga G. Revalorization of glycerol: Comestible oil from biodiesel synthesis. *Food and Bioproducts Processing*. 2009;87(3):171–178.
8. Veiga S, Bussi J. Steam reforming of crude glycerol over nickel supported on activated

carbon. *Energy Conversion and Management*. 2016. *In press*.

9. Milner SE, Maguire AR. Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis. *Arkivoc*. 2012;2012(1):321–382.

10. Sheldon RA, Van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*. 2013;42(42):6223–6235.

11. Zajkoska P, Rebroš M, Rosenberg M. Biocatalysis with immobilized *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97(4):1441–1455.

12. 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.

13. Trelles JA, Rivero CW. Whole Cell Entrapment Techniques. En: Guisan JM, editor. *Immobilization of Enzymes and Cells*. 3rd ed. Madrid: Springer; 2013. p. 365–373.

14. Khanna S, Goyal A, Moholkar VS. Microbial conversion of glycerol: present status and future prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2012;32(3):235–262.

15. Oliveira A, Junior VS. Study of bacteria *Gluconobacter* sp.: isolation, purification, phenotypic and molecular identification. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2010;30(1):106–112.

16. Gupta A, Singh VK, Qazi GN, Kumar A. *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 2001;3(3):445–456.

17. Sato S, Morita N, Kitamoto D, Yakushi T, Matsushita K, Habe H. Change in product selectivity during the production of glyceric acid from glycerol by *Gluconobacter* strains in the presence of methanol. *AMB Express*. 2013;3(1):1–7.

18. Stasiak L, Blazejak S. Acetic acid Bacteria - perspectives of Application in Biotechnology

- a Review. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. 2009;59(1):17–23.

19. Habe H, Fukuoka T, Kitamoto D, Sakaki K. Biotechnological production of d-glyceric acid and its application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009;84(3):445–452.

20. Sato S, Morita T, Fukuoka T, Kitamoto D, Habe H. Microbial resolution of dl-glyceric acid for l-glyceric acid production with newly isolated bacterial strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2015;119(5):554–557.

21. Harrigan WF, Mccance ME. *Laboratory Methods in Microbiology*. Londres: Academic Press; 1966.

22. Boonsaner A, Phuangnui J, Moonmangmee D. Glyceric Acid Production by Thermotolerant Acetic Acid Bacteria. Trabajo presentado en: The 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology; 2010 Octubre 4-6; Pattaya, Tailandia.

23. Black CS, Nair GR. Bioconversion of Glycerol to Dihydroxyacetone by Immobilized *Gluconacetobacter xylinus* Cells. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 2013;4(5):310–314.

24. Campbell I, Priest F. *Brewing Microbiology*. 2da ed. Londres: Springer; 1996.

25. Hemraj V, Diksha S, Avneet G. A review on commonly used biochemical test for bacteria. *Innovare Journal of Life Science*. 2013;1(1):1–7.

26. Franke IH, Fegan M, Hayward C, Leonard G, Sly LI. Molecular detection of *Gluconacetobacter sacchari* associated with the pink sugarcane mealybug *Saccharicoccus sacchari* (Cockerell) and the sugarcane leaf sheath microenvironment by FISH and PCR. *FEMS Microbiology Ecology*. 2000;31(1):61–71.

27. Sato S, Umemura M, Koike H, Habe H. Draft Genome Sequence of *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465, a Glyceric Acid-Producing Strain. *Genome Announcements*. 2013;1(4):3–4.

28. Deppenmeier U, Hoffmeister M, Prust C. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003;60(3):233–242.
29. Habe H, Fukuoka T, Kitamoto D, Sakaki K. Biotransformation of glycerol to D-glyceric acid by *Acetobacter tropicalis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009;81(6):1033–1039.
30. De Vuyst L, Callewaert R, Crabbé K. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology*. 1996;142(4):817–827.
31. Carmichael WW. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*. 1992;72(6):445–459.
32. Shuler ML, Fikret K. *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. 2da ed. Guerrieri P, editor. New Jersey: Prentice Hall; 2002.
33. Habe H, Shimada Y, Fukuoka T, Kitamoto D, Itagaki M, Watanabe K, Yanagishita H, Sakaki K. Production of glyceric acid by *Gluconobacter* sp. NBRC3259 using raw glycerol. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2009;73(8):1799–1805.
34. Penta Transaction. Estadísticas on-line [Internet]. Uruguay: Penta Transaction; Marzo 2017 [citado Marzo 2017]. Disponible desde: www.v4.penta-transaction.com/telematica_v4/login.jsp.

8. Anexos

8.1. Alineamientos de productos de PCR con sus pares teóricos

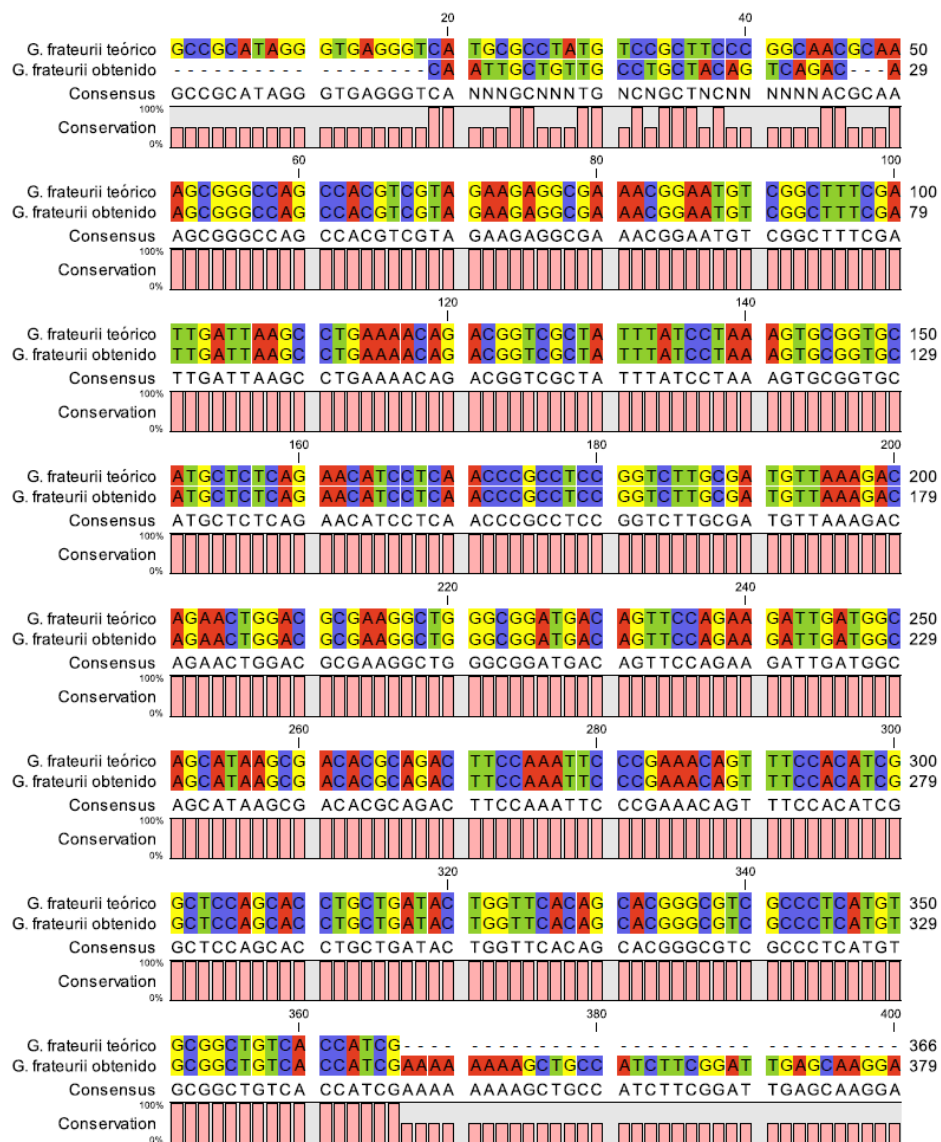


Figura 1A: Alineamiento fragmento obtenido con los cebadores *Frateurii* con la secuencia genómica de *G. frateurii* teórica.

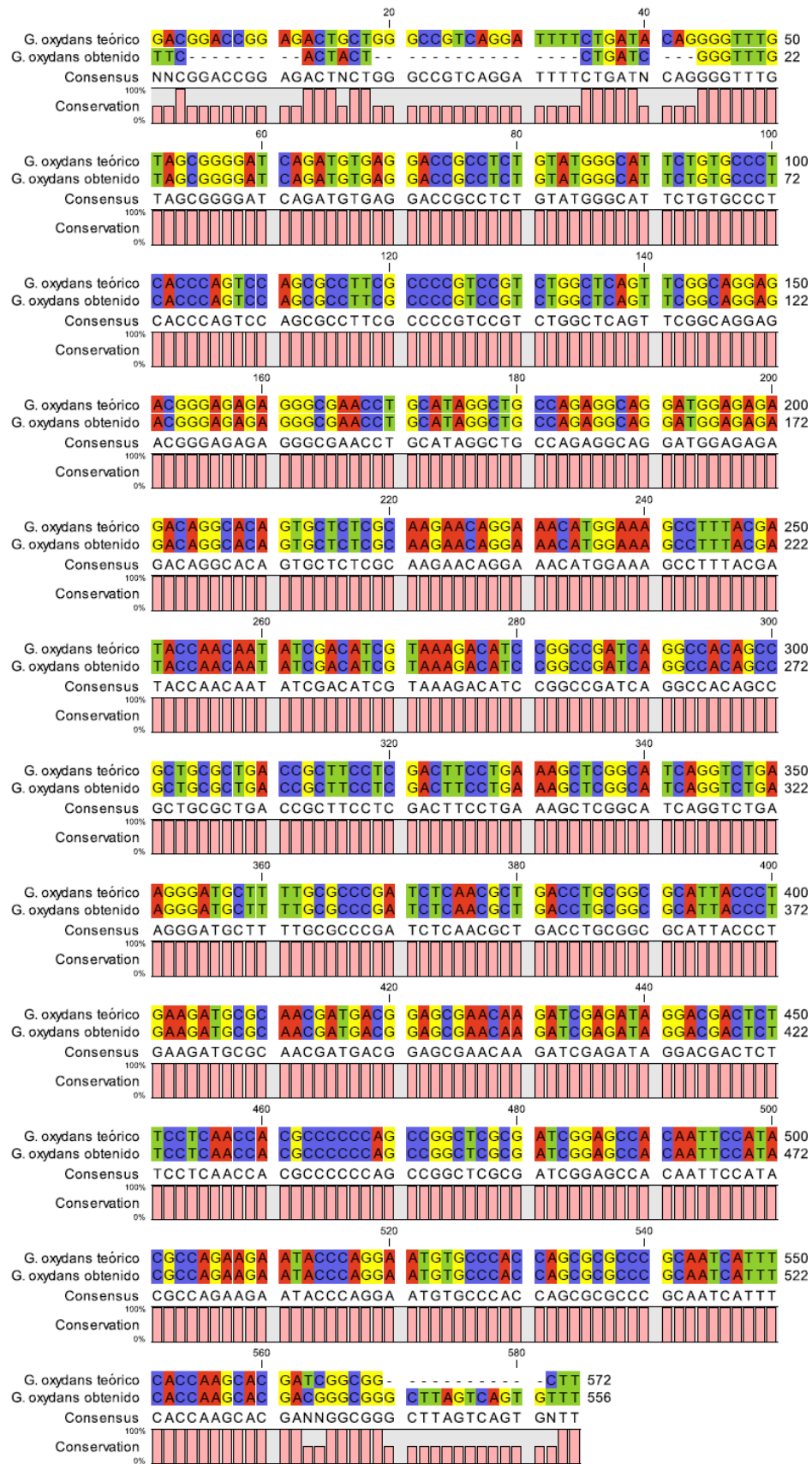


Figura 2A: Alineamiento fragmento obtenido con los cebadores Oxydans con la secuencia genómica de *G. oxydans* teórica.

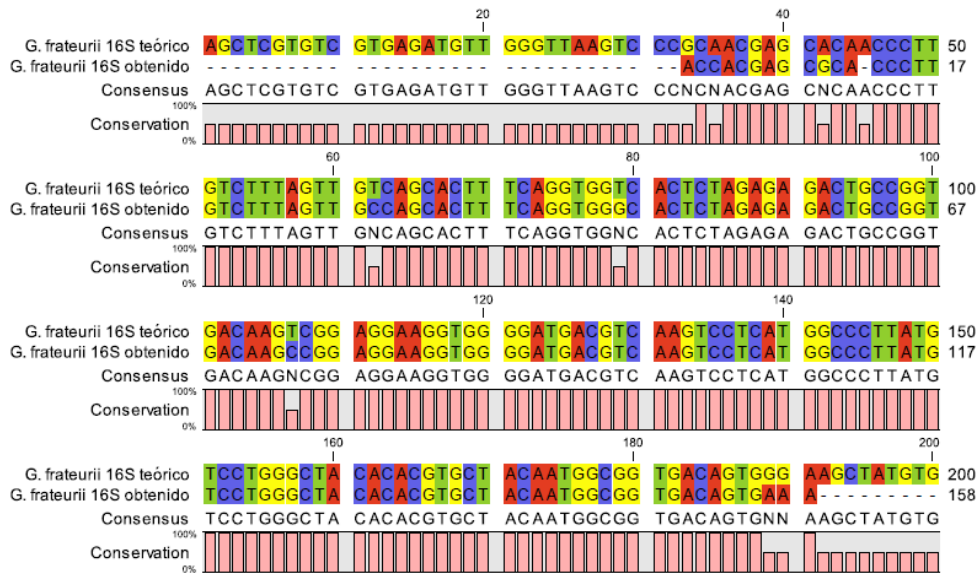


Figura 3A: Alineamiento fragmento obtenido con los cebadores 16S con la secuencia genómica de *G. frateurii* teórica.

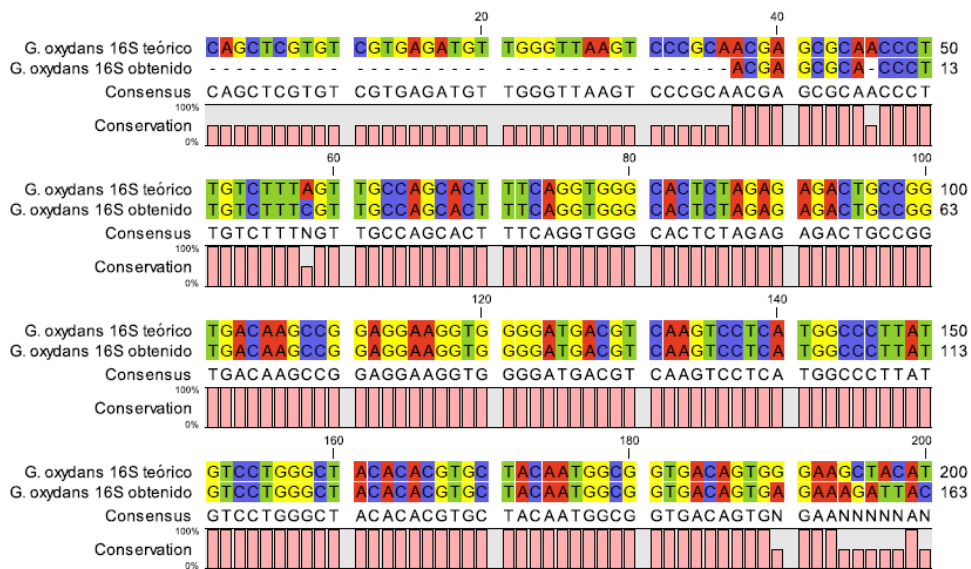


Figura 4A29: Alineamiento fragmento obtenido con los cebadores 16S con la secuencia genómica de *G. oxydans* teórica.

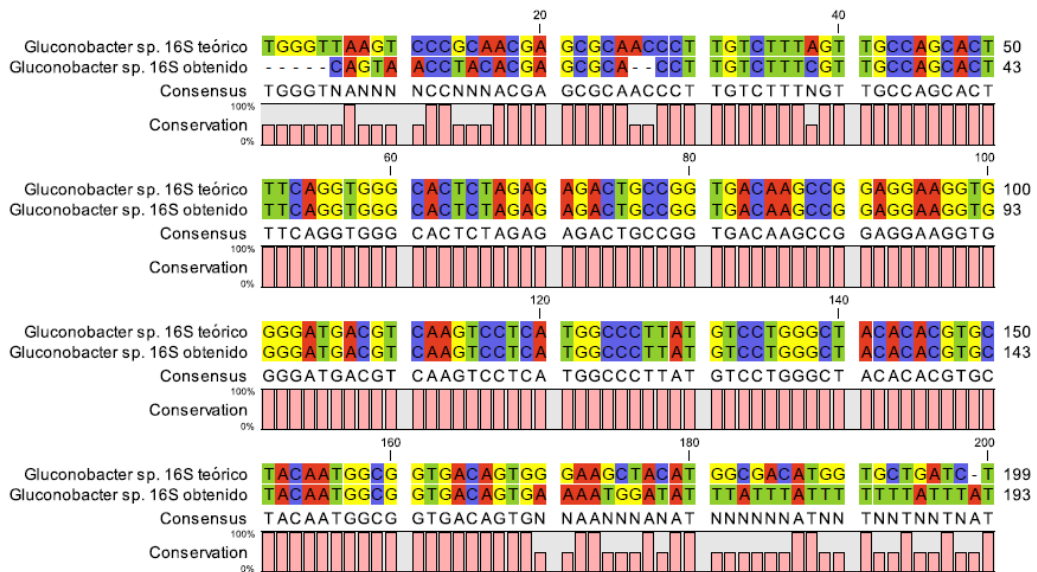


Figura 5A: Alineamiento fragmento obtenido con los cebadores 16s con la secuencia genómica de *Gluconobacter sp* teórica.

8.2. Curvas de calibración de GA y DHA en HPLC

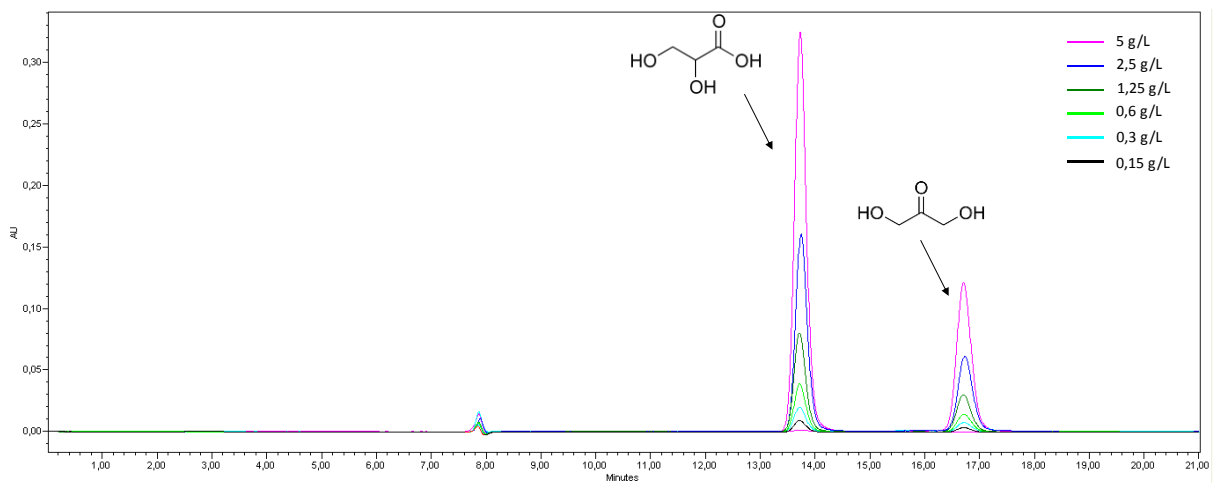


Figura 6A: Análisis por HPLC de DHA y GA. Longitud de onda de detección: 210 nm. Tiempos de retención: 13,7 (GA); 16,7 (DHA).

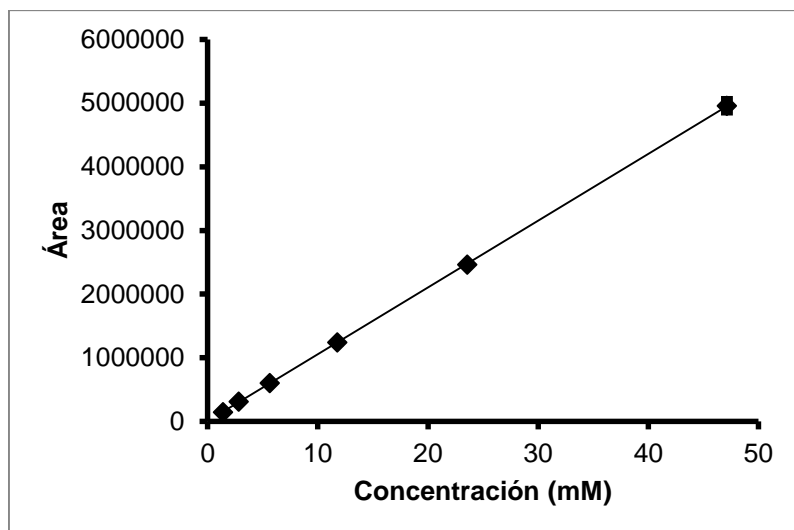


Figura 7A: Curva de calibración para GA, $R^2= 1$.

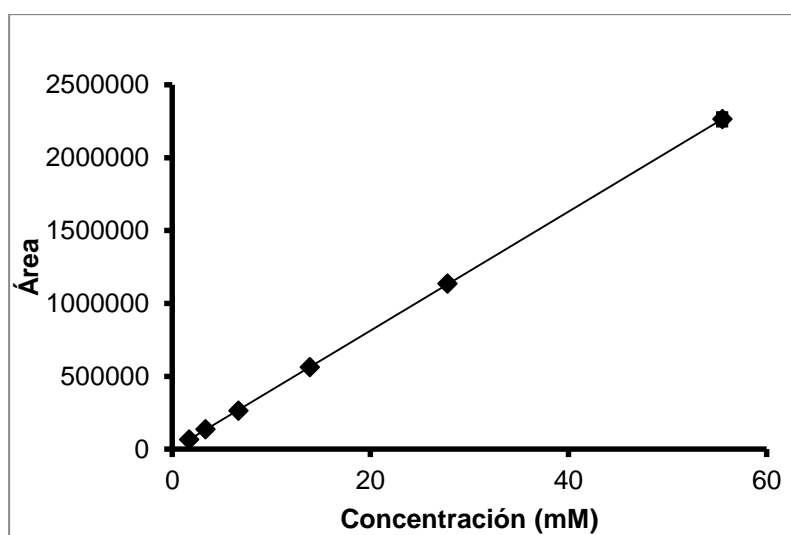


Figura 8A: Curva de calibración para DHA, $R^2= 1$.