

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS TRANSFORMACIONES DEL GLICEROL
CRUDO PROVENIENTE DE LA INDUSTRIA DEL BIODIESEL EN ÁCIDO
LÁCTICO POR UNA CEPA NATIVA DE *Lactobacillus sp* Y *Lactobacillus*
rhamnosus ATCC 7469

PEDRO MIGUEL DIAZ RUIZ

YESSICA PRADA PALOMO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FALCULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA, COLOMBIA

2012

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS TRANSFORMACIONES DEL GLICEROL
CRUDO PROVENIENTE DE LA INDUSTRIA DEL BODIESEL EN ÁCIDO
LÁCTICO POR UNA CEPA NATIVA DE *Lactobacillus sp* Y *Lactobacillus*
rhamnosus ATCC 7469

PEDRO MIGUEL DIAZ RUIZ

YESSICA PRADA PALOMO

Trabajo de grado para optar por el título de Químico

Director

Dr. DANIEL RICARDO MOLINA VELASCO

Codirector

Dra. CAROLINA GUZMÁN LUNA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FALCULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA, COLOMBIA
2012

DEDICATORIA

A Dios, a la memoria de mi Padre.

A mi madre Marina Ruiz a quien atribuyo todos mis éxitos, a su enseñanza moral.

A mis hermanos por sus palabras de ánimo y apoyo en todo momento.

A mi sobrina Jimena quien con su ternura fue una luz en los momentos difíciles.

A mi amiga Katherine Prada a quien quiero y aprecio.

A Doña Helida Palomo por sus sabios consejos y amistad.

A la Dra. Carolina Guzmán que nos enseñó que cada problema es una invitación a la investigación. “Bienvenidos a la investigación”. Gracias profesora.

A Yessica Prada mi mejor amiga, por todas las penas y alegrías vividas juntos, gracias por tu amistad

Pedro Miguel Diaz Ruiz

DEDICATORIA

A Dios Padre celestial por guiarme y darme fortaleza para alcanzar mis sueños,

A mi padre Helí Prada quien siempre recordaré con amor, respeto y orgullo,

A mi madre Helida Palomo por su entrega abnegada y su amor incondicional,

A mi hermanita Katherine por consentirme, brindarme su ternura y comprensión,

Al señor Elberto Carrillo Rincón por sus consejos e incondicional respaldo,

Al profesor Daniel Molina Velasco por su dirección, orientación y apoyo,

A la Dra. Carolina Guzmán quien con sus conocimientos, alegría y buen humor
hizo posible la realización de mi proyecto de grado y

A Pedro Miguel por ser mi compañero de trabajo, mi mejor amigo y brindarme
siempre su cariño a cada instante.

Jessica Prada Palomo

AGRADECIMIENTOS

A los directores del proyecto, Doctor Daniel Ricardo Molina Velasco por su guía y apoyo incondicional durante la elaboración del proyecto y a la Doctora Carolina Guzmán Luna por confiar en nosotros y darnos la oportunidad de ser parte de un grupo de investigación con gran potencial y un futuro brillante y prometedor.

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) convocatoria Interna. Proyecto área estratégica No 5452: Escalamiento de los procesos de producción de bio-alcoholes y procesamiento de subproductos provenientes de la producción de biocombustibles por vía fermentativa.

A los compañeros del grupo de investigación, Natalia Andrea Tarazona Lizcano Bacterióloga de la Universidad Industrial de Santander y a las estudiantes Kshantiji Daniela Africano Gómez y Marly Karolina Romero Vanegas, quienes nos enseñaron los principios básicos de microbiología e hicieron del proceso de aprendizaje una experiencia agradable y enriquecedora.

A los laboratorios de Microbiología, Biotecnología, y Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Industrial de Santander por permitirnos el ingreso a sus instalaciones y el uso de sus equipos.

A las técnicas de bacteriología las señoras Martha, Fanny y Esperanza quienes nos brindaron su motivación, colaboración y servicios durante el desarrollo experimental de nuestro proyecto en la facultad de la salud de la UIS.

Es poco usual encontrarse con personas desinteresadas que ayudan por el placer que esto le causa; al profesor Luis Javier López Giraldo, gracias por su confianza, respaldo y motivación constante en esta etapa.

CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	22
1. FUNDAMENTO TEÓRICO	24
1.1. PRODUCCIÓN DE BIODIESEL Y GLICEROL	24
1.2. PROPIEDADES DEL GLICEROL	24
1.3. FERMENTACIÓN COMO PROCESO DE BIOCONVERSIÓN	25
1.3.1. Microorganismos empleados a nivel industrial	25
1.3.2. Selección de condiciones fisicoquímicas adecuadas para la fermentación	26
1.3.3 Efecto de la temperatura	26
1.3.4. Efecto del pH	27
1.3.5 Efecto de la fuente de carbono	27
1.3.6. Fermentación aeróbica y anaeróbica del glicerol	28
1.4. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ÁCIDO LÁCTICO	30

1.4.1. Bacterias ácido lácticas del género <i>Lactobacillus</i>	30
1.4.2. Conversión del glicerol por las bacterias ácido lácticas	31
1.5. PROPIEDADES DEL ÁCIDO LÁCTICO	32
1.5.1. Fuentes de obtención	33
1.5.2. Síntesis Química	33
1.5.3. Ruta Biotecnológica	34
1.5.4. Aplicaciones del ácido láctico	34
2. MARCO REFERENCIAL	35
3. DISEÑO METODOLÓGICO	38
3.1. AISLAMIENTO DE <i>Lactobacillus sp</i>	39
3.2. SELECCIÓN DE UNA CEPA NATIVA ASIMILADORA DE GLICEROL CRUDO	40
3.3. IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA NATIVA SELECCIONADA (<i>Lactobacillus CYP4</i>)	40
3.4. ADAPTACIÓN DE <i>Lactobacillus CYP4</i> AL GLICEROL CRUDO	41
3.5. EVALUACIÓN DEL PARÁMETRO DE RESPIRACIÓN DE <i>Lactobacillus CYP4</i>	43
3.6. EFECTO DE LAS VARIABLES FISICOQUÍMICAS EN	44

EL CRECIMIENTO DE <i>Lactobacillus</i> CYP4	
3.7. ENSAYO DE FERMENTACIÓN DE CEPA NATIVA Y COMPARACIÓN CON CEPA DE REFERENCIA	45
3.8. CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS DE FERMENTACIÓN	46
3.8.1. Análisis de metabolitos por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)	46
3.8.2. Análisis de metabolitos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	47
3.9. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE BIOCONVERSIÓN DE GLICEROL	48
3.9.1. Porcentaje de conversión de glicerol	48
3.9.2. Rendimiento de la reacción (g/g)	48
3.9.3. Productividad volumétrica (g/L.h)	49
4. RESULTADOS	50
4.1. AISLAMIENTO DE <i>Lactobacillus</i> sp.	50
4.2. SELECCIÓN DE UNA CEPA NATIVA ASIMILADORA DE GLICEROL CRUDO	50
4.3. IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA NATIVA SELECCIONADA	52
4.4. ADAPTACIÓN DE <i>Lactobacillus</i> CYP4 AL GLICEROL CRUDO	53
4.5. EVALUACIÓN DEL PARÁMETRO DE RESPIRACIÓN DE <i>Lactobacillus</i> CYP4	56

4.5.1. Curva de crecimiento aeróbica y anaeróbica de <i>Lactobacillus</i> CYP4 en glicerol crudo	56
4.5.2. Cuantificación de metabolitos por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	57
4.5.3. Fermentación aeróbica de glicerol crudo por <i>Lactobacillus</i> CYP4	57
4.5.4. Fermentación anaeróbica de glicerol crudo por <i>Lactobacillus</i> CYP457	
4.6. EFECTO DE LAS VARIABLES FÍSICOQUÍMICAS EN EL CRECIMIENTO DE <i>Lactobacillus</i> CYP4	58
4.6.1. Efecto de la temperatura	58
4.6.2. Efecto del pH	59
4.6.3. Efecto de la concentración de glicerol crudo	60
4.7. ENSAYO DE FERMENTACIÓN DE CEPA NATIVA Y COMPARACIÓN CON CEPA DE REFERENCIA	61
4.7.1. Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	61
4.7.2. Ensayo comparativo de fermentación <i>Lactobacillus</i> CYP4 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469.	62
4.7.3. Cuantificación de los metabolitos de fermentación por ¹ H-RMN	64

4.7.4. Análisis de metabolitos de fermentación de glicerol crudo	73
4.7.5. Fermentación anaeróbica por <i>Lactobacillus</i> CYP4	73
4.7.6. Fermentación aeróbica por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	76
4.8. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE BIOCONVERSIÓN DE GLICEROL	79
4.8.1. Evaluación del porcentaje de conversión de glicerol	79
4.8.2. Evaluación del rendimiento de la reacción (g/g)	80
4.8.3. Evaluación de la productividad volumétrica de ácido láctico (g/L-h)	81
CONCLUSIONES	83
RECOMENDACIONES	85
DIVULGACIÓN	86
BIBLIOGRAFIA	87
ANEXOS	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reacción de transesterificación	24
Figura 2. Estructura química del glicerol	25
Figura 3. Curva de crecimiento bacteriano	26
Figura 4. Productos finales de degradación de glicerol por diferentes microorganismos	29
Figura 5. Micrografía electrónica de barrido de centrifugado de cultivo (a) y colonias de <i>Lactobacillus sp.</i> (b)	30
Figura 6. Metabolismo del glicerol por parte de bacterias ácido lácticas	32
Figura 7. Estructura del ácido láctico	32
Figura 8. Métodos químicos para obtener ácido láctico.	33
Figura 9. Reacción de ácido láctico en el kit enzimático	37
Figura 10. Esquema de la metodología empleada en la realización del proyecto	38
Figura 11. Kit enzimático RQflex Reflectómetro	40
Figura 12. Glicerol crudo de la industria Bio-D	42
Figura 13. Cámara de anaerobiosis	43
Figura 14. Esquema de trabajo para la elaboración de curva de crecimiento del microorganismo en medio aeróbico y anaeróbico.	44
Figura 15. Ensayo destructivo de evaluación de temperatura, concentración de glicerol crudo y pH del medio	45
Figura 16. Cambio de coloración por asimilación de glicerol USP como fuente carbono y producción de ácidos orgánicos.	51
Figura 17. Curva de crecimiento anaeróbica en glicerol USP de <i>Lactobacillus CYP4</i> sin adaptación	54
Figura 18. Crecimiento de <i>Lactobacillus CYP4</i> a diferentes concentraciones de glicerol USP y crudo	54
Figura 19. Colonias de <i>Lactobacillus CYP4</i> en glicerol crudo (a) y su coloración de Gram (b)	55

Figura 20. Colonias de <i>Lactobacillus</i> CYP4 en glucosa (a) y su coloracion de Gram (b)	55
Figura 21. Curva de crecimiento aeróbica y anaeróbica de <i>Lactobacillus</i> CYP 4 en glicerol crudo	56
Figura 22. Efecto de la temperatura en el crecimiento de <i>Lactobacillus</i> CYP4 en glicerol crudo	59
Figura 23. Efecto del pH en el crecimiento de <i>Lactobacillus</i> CYP4 en glicerol crudo.	59
Figura 24. Efecto de la concentración de glicerol crudo en el crecimiento de <i>Lactobacillus</i> CYP4	60
Figura 25. Curva de crecimiento aeróbica y anaeróbica de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 en glicerol crudo	61
Figura 26. Curva de crecimiento aeróbica de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 en glicerol USP	62
Figura 27. Ensayo comparativo de fermentación de <i>Lactobacillus</i> CYP4 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 en glicerol crudo	63
Figura 28. Cámara de Neubauer (a). Recuento de colonias al inicio de Ampliación de la regilla de recuento (b).	64
Figura 29. Espectro ¹ H-RMN (400 MHz, HDO) de la N, N-dimetilformamida	65
Figura 30. Espectro ¹ H-RMN (400 MHz, HDO) del ácido láctico	66
Figura 31. Espectro ¹ H-RMN (400 MHz, HDO) de glicerol crudo	67
Figura 32. Espectro ¹ H-RMN (400 MHz, HDO) mezcla de glicerol crudo y ácido láctico.	68
Figura 33. Espectro ¹ H-RMN (400 MHz, HDO) de etanol.	68
Figura 34. Curva de crecimiento y consumo anaeróbico de glicerol crudo por <i>Lactobacillus</i> CYP4	73
Figura 35. Ruta metabólica anaeróbica de fermentación de glicerol crudo por <i>Lactobacillus</i> CYP4	74
Figura 36. Metabolitos de fermentación anaeróbica de glicerol crudo por <i>Lactobacillus</i> CYP4	75
Figura 37. Curva de crecimiento y consumo aeróbico de glicerol crudo por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	76

Figura 38. Ruta metabólica de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	77
Figura 39. Metabolitos de fermentación aeróbica de glicerol crudo por <i>Lactobacillus</i> ATCC 7469	78
Figura 40. Comparación porcentaje de conversión de glicerol crudo entre <i>Lactobacillus</i> CYP4 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	80
Figura 41. Comparación del rendimiento de ácido láctico entre <i>Lactobacillus</i> CYP4 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469.	80
Figura 42. Comparación de productividad volumétrica de ácido láctico entre <i>Lactobacillus</i> CYP4 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469.	82

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición de agar MRS.	39
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del glicerol crudo empleado	42
Tabla 3. Cepas de <i>Lactobacillus sp</i> aisladas de lácteos, frutas y verduras.	50
Tabla 4. Resultados prueba de fermentación de glicerol USP para las cepas <i>Lactobacillus sp</i> seleccionadas	51
Tabla 5. Resultados medición de ácido láctico a partir de glicerol USP para las cepas <i>Lactobacillus sp</i> seleccionadas	52
Tabla 6. Metabolitos de fermentación anaeróbica de glucosa por <i>Lactobacillus CYP4</i>	53
Tabla 7. Metabolitos de fermentación aeróbica y anaeróbica de glicerol crudo por <i>Lactobacillus CYP4</i> a las 24 horas	58
Tabla 8. Recuento de colonias de <i>Lactobacillus CYP4</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 en el tiempo inicial de la fermentación	63
Tabla 9. Áreas de glicerol y metabolitos en la fermentación anaeróbica de glicerol crudo por <i>Lactobacillus CYP4</i>	71
Tabla 10. Cuantificación de glicerol y metabolitos en la fermentación anaeróbica de glicerol crudo por <i>Lactobacillus CYP4</i>	71
Tabla 11. Áreas de glicerol y metabolitos en la fermentación anaeróbica de glicerol crudo por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	72
Tabla 12. Concentración de glicerol y metabolitos en la fermentación anaeróbica de glicerol crudo por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	72
Tabla 13. Parámetros productivos de glicerol crudo a ácido láctico de las cepas evaluadas.	79
Tabla 14. Comparación del rendimiento de ácido láctico utilizando otras fuentes de carbono y otros microorganismos.	81
Tabla 15. Comparación de la productividad volumétrica de ácido láctico utilizando otras fuentes de carbono y otros microorganismos.	82

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Nomenclatura de las enzimas implicadas en las rutas bioquímicas	9393
Anexo B. Protocolo prueba de tinción de Gram	94
Anexo C. Protocolo prueba de catalasa	95
Anexo D. Protocolo de criopreservación	96
Anexo E. Prueba de fermentación de azúcares	98
Anexo F. Curvas de calibración de HPLC	100
Anexo G. Cromatogramas de fermentación anaeróbica de glucosa a las 24 horas por <i>Lactobacillus</i> CYP4	104
Anexo H. Cromatogramas de fermentación aeróbica de glicerol crudo a las 24 horas por <i>Lactobacillus</i> CYP4	106
Anexo I. Cromatogramas de fermentación anaeróbica de glicerol crudo a las 24 horas por <i>Lactobacillus</i> CYP4	108
Anexo J. Espectros de ¹ H-RMN (400 MHz, HDO) para los metabolitos de fermentación de <i>Lactobacillus</i> CYP4 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	110

RESUMEN

TÍTULO: PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO LÁCTICO POR UNA CEPA NATIVA DE *Lactobacillus sp* A PARTIR DE GLICEROL CRUDO PROVENIENTE DE LA INDUSTRIA DEL BIODIESEL*

AUTORES: YESSICA PRADA PALOMO, PEDRO M. DÍAZ RUIZ. **

PALABRAS CLAVE: Glicerol Crudo, Fermentación, *Lactobacillus sp*, Ácido Láctico RMN.

La producción biotecnológica de ácido láctico por fermentación de glicerol crudo del biodiesel se realizó por medio de una cepa nativa de *Lactobacillus* y una cepa de referencia: *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. El microorganismo nativo fue seleccionado a partir de un screening realizado en diferentes matrices lácteas, de frutas y de verduras e identificado por pruebas bioquímicas y denominado como *Lactobacillus* CYP4

Se adaptó el microorganismo al glicerol crudo como nueva fuente de carbono y se analizaron las condiciones de oxígeno (aerobiosis y anaerobiosis) más favorables para su crecimiento, concluyéndose que es un microorganismo anaerobio facultativo. Los análisis de cromatografía líquida de alta eficiencia revelaron que el mayor consumo de glicerol y producción de ácido láctico se obtuvieron en condiciones anaeróbicas. Por otra parte, el estudio de las variables fisicoquímicas del proceso de fermentación indicó que a una temperatura de 37°C, pH 5,5, concentración de glicerol de 217,17 mM, en condiciones de anaerobiosis, fueron las adecuadas tanto para el crecimiento del microorganismo nativo como para la producción de ácido láctico.

Finalmente la comparación de bioconversión de glicerol a ácido láctico de los dos microorganismos evaluados demostró que la cepa nativa fue capaz de producir mayor cantidad de ácido láctico (39,41mM) que la cepa de referencia (10,11 mM). Los metabolitos obtenidos en las fermentaciones, fueron cuantificados por el método de Resonancia Magnética Nuclear de protones. Estos resultados demostraron que el microorganismo nativo aislado, es una cepa promisoría para la transformación de un residuo industrial como lo es el glicerol crudo del biodiesel en compuestos de mayor valor agregado como ácido láctico y etanol.

*Proyecto de grado.

**Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director Dr. Daniel Ricardo Molina Velasco, Codirectora Dra. Carolina Guzmán Luna.

ABSTRACT

TITLE: BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF LACTIC ACID BY A NATIVE STRAIN OF *LACTOBACILLUS* SP FROM CRUDE GLYCEROL FROM BIODIESEL INDUSTRY.*

AUTHORS: YESSICA PRADA PALOMO, PEDRO M. DIAZ RUIZ**

Key Words: Crude Glycerol, Fermentation, *Lactobacillus*, Lactic Acid, NMR.

The biotechnological production of lactic acid by fermentation of crude glycerol from biodiesel was made by a native strain of *Lactobacillus* and a reference strain, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. The native organism was selected from a screening carried out in different fruits and vegetables dairy matrices and identified by biochemical tests and referred to as *Lactobacillus* CYP4.

The microorganism was adapted to the new crude glycerol as carbon source and the most favorable oxygen conditions (aerobic and anaerobic) for its growth were analyzed, concluding that it is a facultative anaerobic organism. The analysis of high performance liquid chromatography revealed that increased consumption of glycerol and lactic acid production was obtained under anaerobic conditions. Moreover, the study of the physicochemical variables of the fermentation process indicated that a temperature of 37 ° C, pH 5,5, glycerol concentration 217,17 mM, under anaerobic conditions were appropriate for both the growth of the native microorganism to the production of lactic acid.

Finally the comparison of glycerol bioconversion to lactic acid of the two microorganisms tested showed that the native strain was able to produce more lactic acid (39,41 mM) as the reference strain (10,11 mM). The metabolites obtained in the fermentations were quantified by the method of proton NMR (Nuclear Magnetic resonance). These results demonstrated that the microorganism isolated, is a promising strain for the transformation of an industrial waste such as biodiesel crude glycerol in higher value-added compounds such as lactic acid and ethanol.

*Degree Project.

**Universidad Industrial de Santander, Science Faculty, Chemistry School. Director Dr. Daniel Ricardo Molina Velasco, Codirectora Dra. Carolina Guzmán Luna.

INTRODUCCIÓN

El glicerol es el principal subproducto de la industria del biodiesel obtenido a partir del aceite de palma y equivale entre el 10% y 40% (p/p) de su producción. En Colombia en el año 2011 se produjeron 365,664 toneladas de biodiesel que generaron 36,566 toneladas de glicerol crudo (Federación nacional de biocombustibles de Colombia) y para el 2020 se espera que su producción sea seis veces mayor que la demanda en el mercado. Su sobreproducción ha generado una sobreoferta en el mercado mundial y ha llevado a que su precio descienda a valores mínimos, a tal punto que se considera un residuo industrial, provocando el cierre de su producción por síntesis química en empresas como Dow Chemical y Procter and Gamble Chemical (Da Silva, 2009; Yazdani, 2007). Dado que las ventas de glicerol han representado una rentabilidad importante en la industria del biodiesel, es razonable que sus bajos precios afecten negativamente la economía de los productores de biodiesel. Por estas razones se requiere que el glicerol crudo, se utilice como materia prima y se transforme en productos de mayor valor agregado (Johnson, 2007).

Se han propuesto diversas estrategias basadas en transformaciones químicas y biológicas para la conversión del glicerol en productos como 1,3 propanodiol, ácido láctico, ácido acético y etanol. La conversión por medio de catálisis química produce baja especificidad en los productos, necesita el uso de altas presiones y temperaturas y además existe la imposibilidad de utilizar el glicerol crudo por los altos niveles de contaminantes (Da Silva, 2009). La bioconversión por su parte, permite transformar el glicerol crudo en ácidos orgánicos como ácido láctico, succínico y acético además de alcoholes como etanol, beneficiando directamente el ambiente, promoviendo el uso del biodiesel y reduciendo la dependencia del petróleo (Da Silva, 2009).

El ácido láctico está siendo considerado como una materia prima de gran valor en la industria química para la fabricación de plásticos y resinas. Sin embargo muchos productores todavía continúan utilizando sustratos fácilmente fermentables como glucosa, sacarosa y almidón los cuales se obtienen del maíz, patatas, yuca y cebada que son indispensables para alimentación humana (Rojan, 2009). Por lo anterior el glicerol crudo de la industria del biodiesel es muy promisorio como materia prima en la producción de biopolímeros puesto que no compite con los alimentos.

Con el propósito de contribuir en la investigación de estrategias para la conversión del glicerol en productos de mayor valor agregado, este proyecto centró su atención en la producción de ácido láctico vía biotecnológica por medio de microorganismos nativos del género *Lactobacillus sp*, utilizando como fuente de carbono glicerol crudo procedente de la industria de biodiesel.

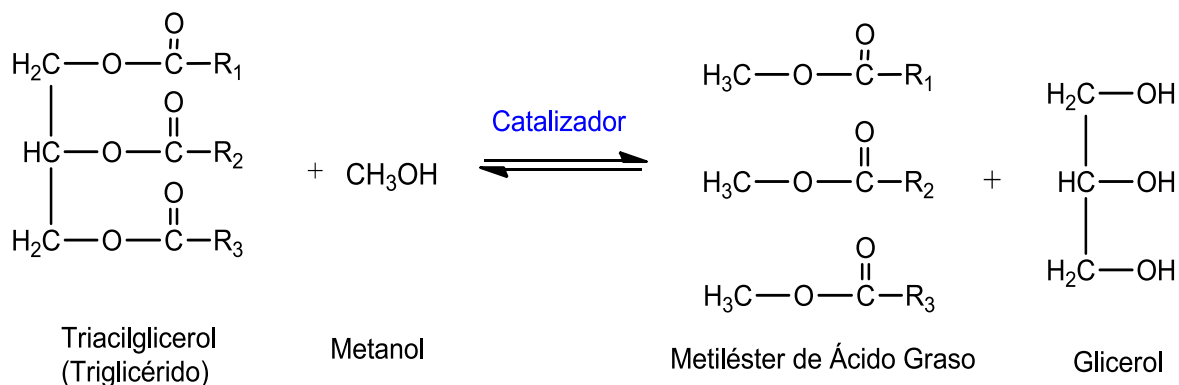
Dado que las variables fisicoquímicas influyen significativamente en el metabolismo del microorganismo, también se estudió la influencia de la temperatura, la concentración de glicerol crudo, el pH y la atmósfera de oxígeno en el proceso de fermentación. La caracterización y cuantificación del ácido láctico y el consumo de glicerol crudo se llevó a cabo empleando las técnicas: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) y Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN.

FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1. PRODUCCIÓN DE BIODIESEL Y GLICEROL

El glicerol proveniente de la industria del biodiesel es producido mediante una reacción de transesterificación a partir de grasas vegetales en presencia de un catalizador que puede ser NaOH o KOH. En esta reacción (Zapata *et al.*, 2007), las moléculas de triglicéridos de gran tamaño y ramificadas se transforman en moléculas de menor tamaño de ésteres alquílicos de ácidos grasos (Biodiesel) y glicerol **Figura 1**.

Figura 1. Reacción de transesterificación



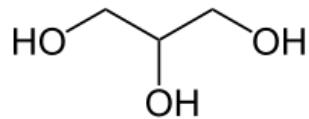
Fuente: Zapata *et al.*, 2007

1.2. PROPIEDADES DEL GLICEROL

El glicerol también conocido como glicerina, es un alcohol con tres grupos hidroxilos tal como se muestra en la **Figura 2**. Es líquido a temperatura ambiente de 25 °C, higroscópico, inodoro, viscoso y de sabor dulce.

El glicerol se puede obtener a partir de fermentaciones microbianas, síntesis química de materias primas de los derivados del petróleo y también puede ser recuperado de la manufactura de jabones. El glicerol no solo es económico y abundante, sino también ofrece una oportunidad de producir sustancias químicas con alto rendimiento debido a su poder de reducción entre las cuales están alcoholes, ácidos orgánicos y otros compuestos oxigenados (Da Silva, 2009).

Figura 2. Estructura química del glicerol



Fuente: Jernigan, 2010

1.3. FERMENTACIÓN COMO PROCESO DE BIOCONVERSIÓN

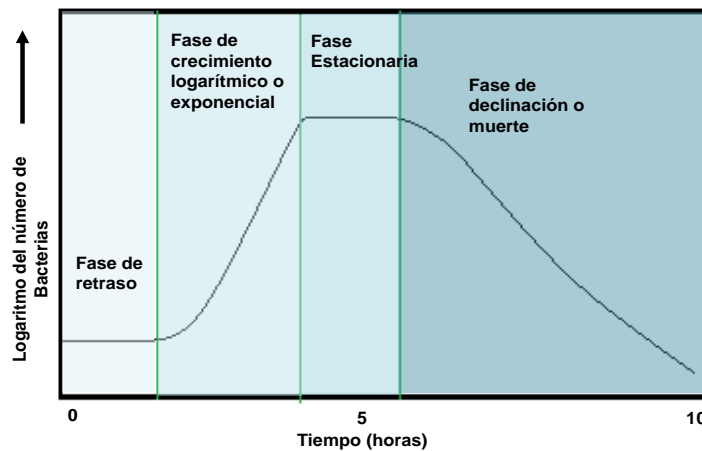
Los procesos microbiológicos se basan en el uso de microorganismos cultivados generalmente a gran escala, para obtener productos industriales de gran valor agregado a partir de procesos de fermentación. El proceso de fermentación se define como la transformación de compuestos orgánicos realizada por microorganismos con la ayuda de enzimas. Es llevada a cabo en un fermentador o biorreactor, mediante el cual los sustratos del medio de cultivo son transformados en biomasa y metabolitos (Ertola *et al.*, 2007).

1.3.1. Microorganismos empleados a nivel industrial

Los microorganismos empleados en los procesos de fermentación deben ser preferiblemente no patógenos, que fermenten rápida y completamente los sustratos (Serna, 2005) y sinteticen el producto deseado en un corto periodo de tiempo. Su curva de crecimiento presenta cuatro etapas bien definidas (Tortora,

2007): fase de retraso o de síntesis de enzimas y otras moléculas; fase logarítmica o exponencial de alta reproducción celular, máxima actividad metabólica y alta eficiencia de productos; fase estacionaria en la cual número de células muertas compensa el de células nuevas y finalmente fase de declinación o muerte celular como se observa en la **Figura 3**.

Figura 3. Curva de crecimiento bacteriano



Fuente: Tortora, 2007

1.3.2. Selección de condiciones fisicoquímicas adecuadas para la fermentación

Las principales variables en el proceso de fermentación son: temperatura, pH, y concentración de nutrientes -incluido el oxígeno- (Gaden, 1959).

1.3.3. Efecto de la Temperatura

No solo afecta el crecimiento del microorganismo, también influye en la producción de metabolitos. Al ser las fermentaciones reacciones enzimáticas, la dependencia de la temperatura no es tipo Arrhenius ya que conforme esta aumenta, las enzimas pueden desplegarse y/o desnaturalizarse, perdiendo su actividad catalítica. En consecuencia a medida que la temperatura se incrementa, la

velocidad de reacción llega a un máximo y después disminuye conforme la temperatura continúa elevándose (Scott, 2008).

En la velocidad de crecimiento también existe un óptimo debido a la competencia entre el aumento de velocidad al elevarse la temperatura y la desnaturalización de la enzima (Scott, 2008). La mayoría de microorganismos industriales tienen su temperatura óptima de crecimiento y producción de metabolitos entre 20° y 40°C (Greasham, 1993).

1.3.4. Efecto del pH

Afecta el crecimiento y la producción de metabolitos, ya que influye en la toma de nutrientes y otras actividades fisiológicas. En general las enzimas trabajan en un rango de 4 a 9; el óptimo para el crecimiento de las bacterias está entre 6,5 y 7,5, mientras que el de los hongos y levaduras es entre 4,5 y 5,5. Adicionalmente, el pH óptimo de crecimiento puede no ser el de óptima formación de metabolitos (Scott, 2008; Greasham, 1993). Para evaluar la influencia del pH en el microorganismo seleccionado, se evaluará su crecimiento a diferentes valores.

1.3.5. Efecto de la fuente de carbono

Los nutrientes elementales y específicos que requiere el microorganismo son fuente de carbono, fuente de nitrógeno, minerales y oxígeno (Greasham, 1993).

Como fuente de carbono se utilizan compuestos de carbono reducidos, siendo sus funciones: construir masa celular, formar producto y actuar como fuente de energía. A ciertas concentraciones, la fuente de carbono (sustrato) puede actuar como inhibidor; es decir puede reprimir una o más enzimas responsables de la formación de producto (Scott, 2008; Greasham, 1993).

Los requerimientos minerales de la mayoría de microorganismos, son satisfechos agregando al medio, sales de fosfato, sulfato, magnesio, hierro, potasio y cloro. Y

los elementos traza requeridos (Cu, Zn, Co, Mb y Ca) usualmente se satisfacen por los contaminantes presentes en el agua y en los otros constituyentes del medio. Por último, la transferencia de oxígeno se logra por medio de la agitación (Greasham, 1993).

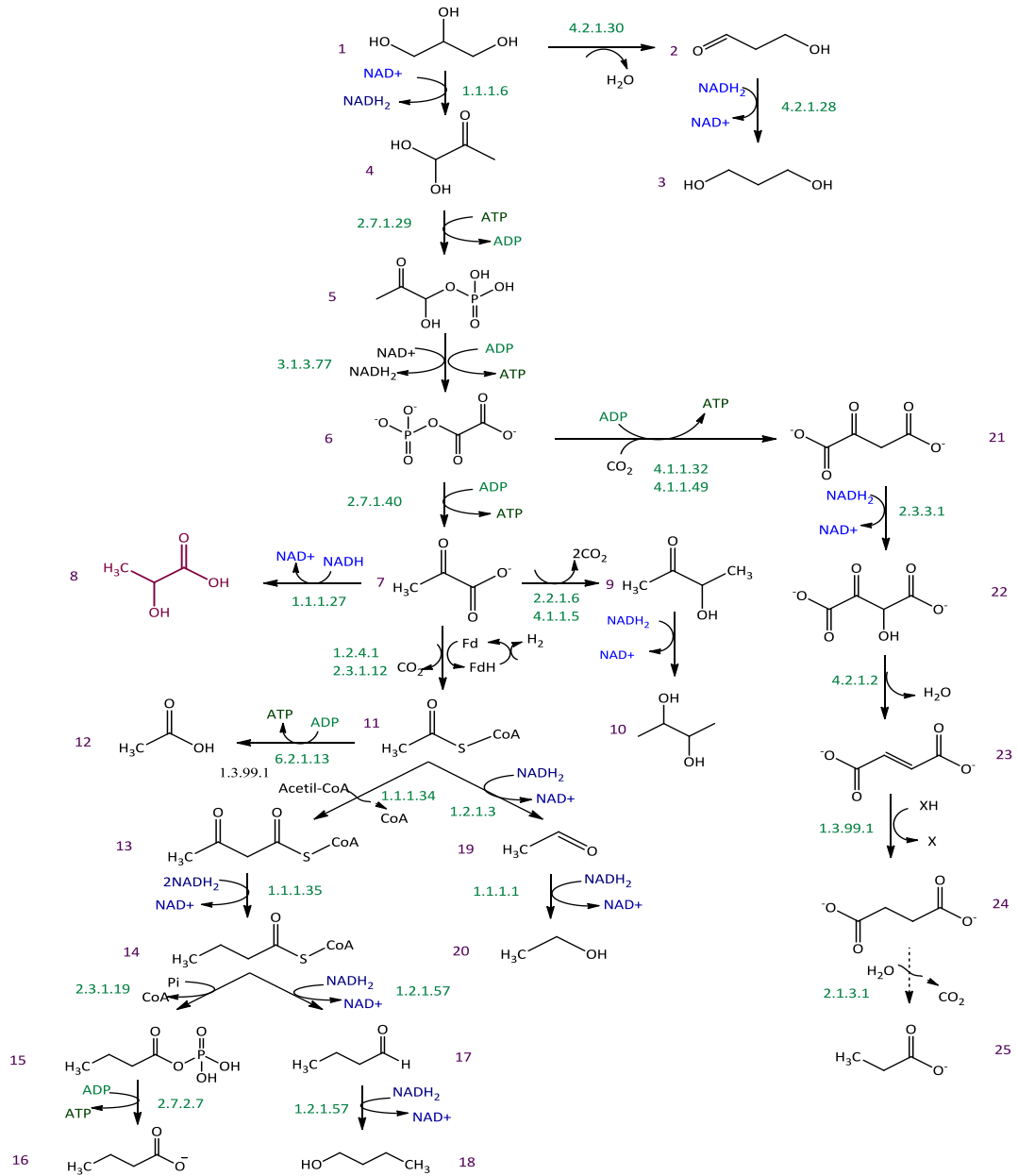
Los procesos fermentativos emplean dos medios, uno para el desarrollo del inóculo y otro para la producción de metabolitos. La función del primero es permitir crecer al microorganismo con la menor formación de producto posible, la del segundo se explica por sí mismo (Greasham, 1993).

1.3.6. Fermentación aeróbica y anaeróbica del glicerol

El glicerol puede ser fermentado por una gran variedad de microorganismos que son capaces de desarrollarse utilizando este sustrato como única fuente de carbono y energía, en presencia de oxígeno (aerobiosis) o ausencia de éste (anaerobiosis). Algunos de estos géneros son *Klebsiella*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Bacillus* y *Lactobacillus* entre otros.

La **Figura 4** muestra los posibles productos finales de la degradación de glicerol y en el ANEXO A se encuentra la nomenclatura de las enzimas implicadas en las rutas bioquímicas. Los productos dependen esencialmente del tipo de microorganismo y las enzimas involucradas en su metabolismo. Existen microorganismos que son homofermentativos (un solo producto de fermentación) y otros heterofermentativos (múltiples productos de fermentación) (Da Silva, 2009; Serna 2005).

Figura 4. Productos finales de degradación de glicerol por diferentes microorganismos



1. glicerol, 2. 3-hidroxiopropionaldehido, 3. 1,3-propanodiol, 4. Dihidroxiacetona, 5. Dihidroxiacetona-fosfato, 6. Fosfoenolpiruvato, 7. Piruvato, 8. Ácido láctico, 9. Acetoina, 10. 2,3-butanodiol, 11. Acetil-CoA, 12. Ácido acético, 13. Acetoacetyl-CoA, 14. Butiril-CoA, 15. Butiril-fosfato, 16. Butirato, 17. Butiraldehído, 18. Butanol, 19. Acetaldehído, 20. Etanol, 21. Oxaloacetato, 22. Malato, 23. Fumarato, 24. Succinato, 25. Propianato.

Fuente: Da Silva, 2009

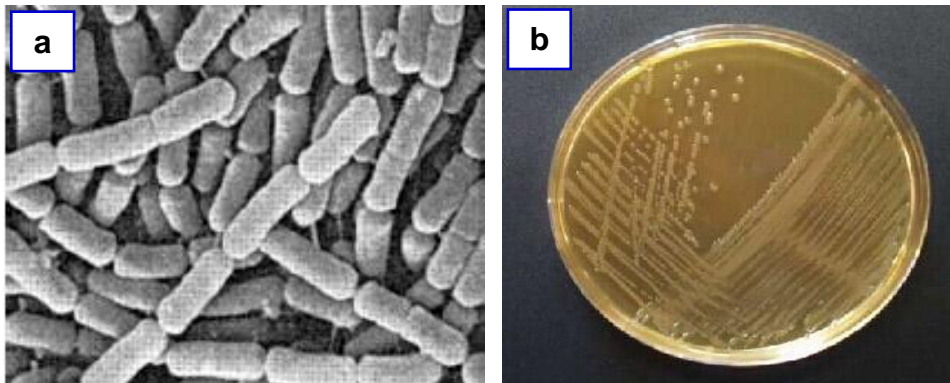
1.4. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ÁCIDO LÁCTICO

Las bacterias que pueden utilizarse para la producción de ácido láctico (bacterias ácido lácticas) son cocos y bacilos grampositivos, anaerobios facultativos pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Pedicoccus*, *Vagococcus*, *Enterococcus* entre otras (Serna, 2005).

1.4.1. Bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*

Las células individuales de especies de *Lactobacillus* a menudo forman cadenas largas y delgadas (**Figura 5.a**), aunque pueden observarse bacilos “corineformes” o “cocobacilos” más pequeños. Forman colonias blancas opacas (**Figura 5.b**). Los lactobacilos son catalasa negativos y no forman esporas. Sus paredes celulares contienen un peptidoglicano grueso y ácidos teicoicos ligados a la membrana por lo cual la tinción de Gram da una coloración violeta (Winn, 2008).

Figura 5. Micrografía electrónica de barrido de centrifugado de cultivo (**a**) y colonias de *Lactobacillus* sp. (**b**)



Fuente: Frioni, 1999

Este género es anaerobio facultativo, 20% son anaerobios estrictos y en ocasiones microaerófilos siendo raras veces patógenos. Crecen mal en

presencia de aire, su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C-40°C con un pH óptimo de desarrollo entre 5,5 y 6,2. Se denominan así porque más del 50% de los productos terminales de fermentación de la glucosa es el ácido láctico. Algunas especies pueden producir también ácidos acético, fórmico y succínico, junto con CO₂.

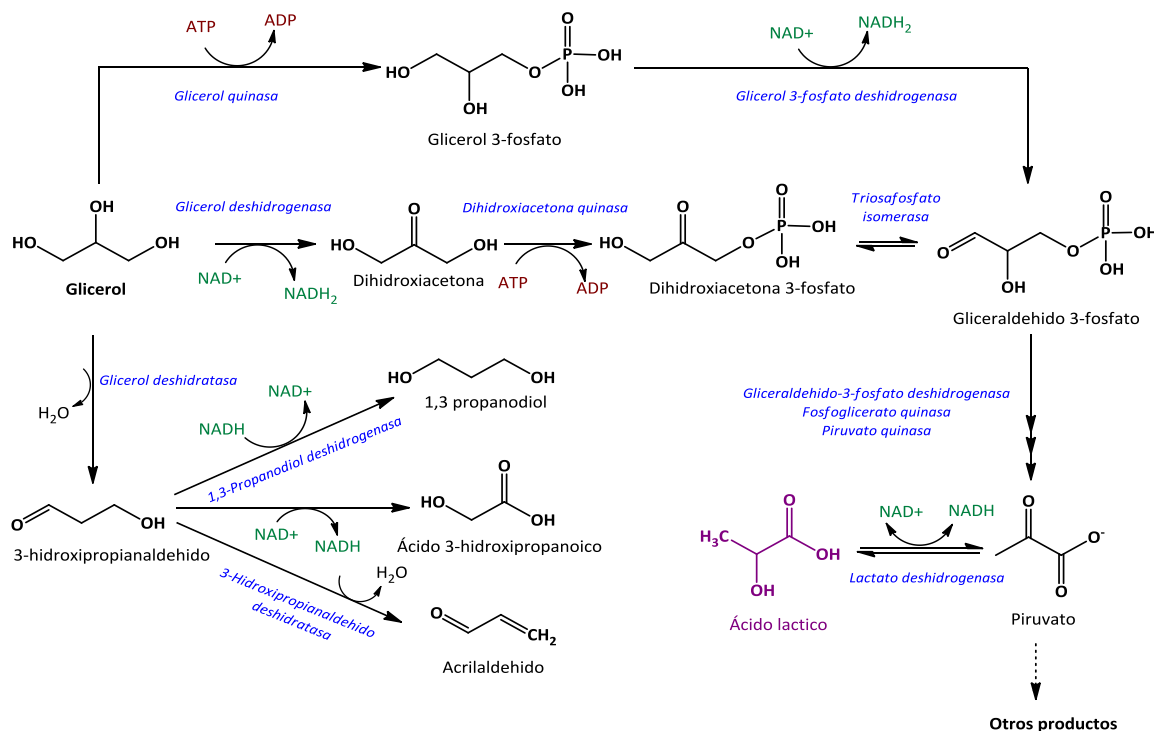
Forman parte de la flora normal de la vagina, el tubo digestivo y la faringe. Están ampliamente distribuidos en diversos ámbitos como fuentes de aguas naturales, aguas servidas y silos. También se encuentran en distintos alimentos como productos lácteos, granos, comidas, peces y chucrut (Winn, 2008).

1.4.2. Conversión de glicerol por las bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas, pueden degradar el glicerol gracias a su metabolismo enzimático. Una ruta es convirtiendo el glicerol en gliceraldehído 3-fosfato usando la enzima glicerol quinasa (EC 2.7.1.30) y posteriormente a través de la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (EC 1.2.1.12) se convierte en gliceraldehído 3-fosfato, el cual entra en la ruta de la glucólisis (**Figura 6**).

La segunda ruta es usando la enzima glicerol deshidrogenasa (EC 1.1.1.6) donde el glicerol se transforma en dihidroxiacetona, la cual es fosforilada por dihidroxiacetona quinasa (EC 2.7.1.29) a dihidroxiacetona-fosfato. En la tercera ruta el glicerol se deshidrata por la acción de una glicerol deshidratasa (EC 4.2.1.30) a 3-hidroxi-propanaldehído, el cual se reduce a 1,3-propanodiol mediante una 1,3-propanodiol deshidrogenasa (EC 4.2.1.28) o se oxida a ácido 3-hidroxi-propiónico.

Figura 6. Metabolismo del glicerol por parte de bacterias ácido lácticas

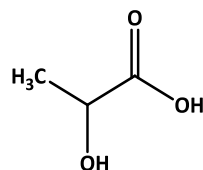


Fuente: Garai, 2010

1.5. PROPIEDADES DEL ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico es un ácido carboxílico con un grupo hidroxilo en el carbono adyacente al grupo carboxilo como se observa en la **Figura 7**. Es un líquido viscoso, sin olor, sin color y no volátil. Posee un carbono quiral el cual da lugar a actividad óptica. Existen dos isómeros ópticos el D (-) láctico y L (+) láctico. La configuración L (+) es la metabolizada por el organismo humano (Bogaert, 2000).

Figura 7. Estructura del ácido láctico



Fuente: Bogaert, 2000

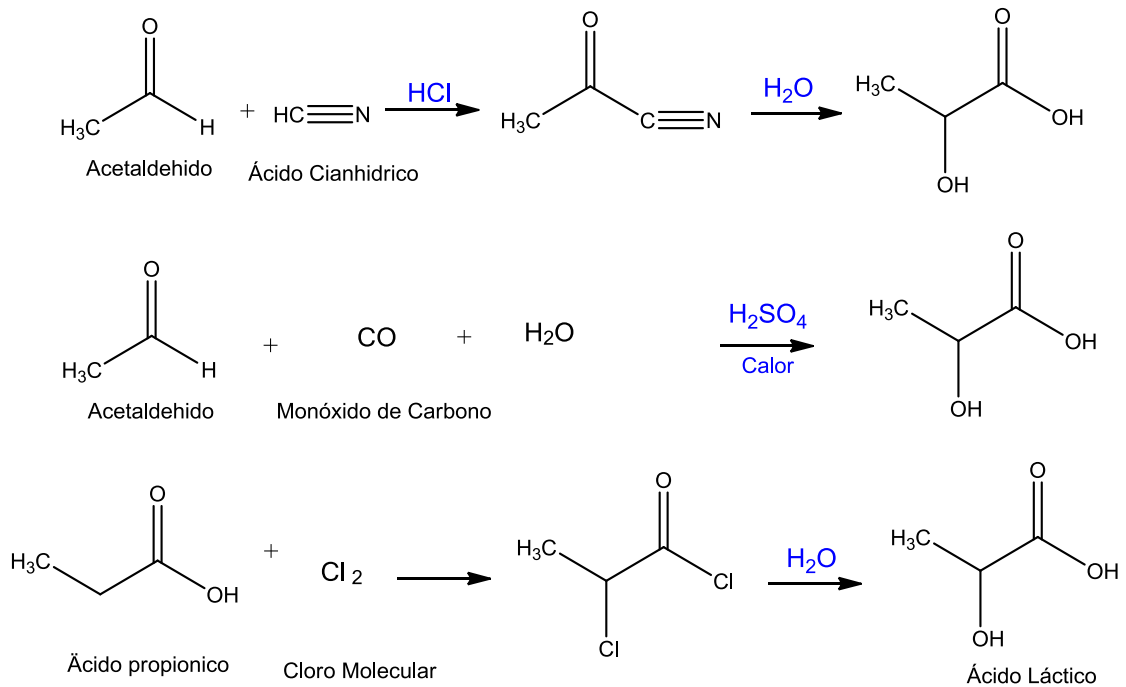
1.5.1. Fuentes de obtención

El ácido láctico puede ser obtenido por vía química o biotecnológica (Serna, 2005)

1.5.2. Síntesis Química

Una ruta es la reacción del acetaldehído con ácido cianhídrico (HCN), para dar lactonitrilo, que puede ser hidrolizado a ácido láctico (**Figura 8**) (Wee, 2006). Otra ruta es la reacción a alta temperatura de acetaldehído con monóxido de carbono y agua en presencia de ácido sulfúrico como catalizador. Igualmente puede producirse por cloración y subsiguiente hidrólisis del ácido propiónico (Orozco, 2003).

Figura 8. Métodos químicos para obtener ácido láctico.



Fuente: Serna, 2005

La síntesis química tiene la desventaja de producir una mezcla ópticamente inactiva de D (-) y L(+) ácido láctico. Además se emplean métodos que involucran altas presiones, temperaturas y solventes tóxicos. Por lo anterior el 90% del ácido producido en el mundo es elaborado por la vía biotecnológica (Serna, 2005; Yazdani 2007)

1.5.3. Ruta Biotecnológica

La ruta biotecnológica está basada en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por bacterias u hongos. Tiene la ventaja de formar enantiómeros D(-) o L(+), ópticamente activos dependiendo del tipo de microorganismo, el pH, la temperatura, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno y el modo de fermentación empleado (Bogaert, 2000). Se utilizan como sustratos la sacarosa proveniente del lactosuero y la dextrosa proveniente del almidón hidrolizado. La sacarosa refinada y la glucosa son los más utilizados, pero debido al alto costo del azúcar, se han empleado materiales celulósicos, licores sulfíticos, granos y tubérculos como materia prima de fermentación (Serna, 2005).

1.5.4. Aplicaciones del ácido láctico

Los principales usos están asociados con la industria alimentaria, cerca del 50% se utiliza como aditivo acidulante, aromatizante, tamponante del pH y como inhibidor del deterioro causado por otras bacterias en alimentos preparados. Otros usos se encuentran en las industrias química, farmacéutica y cosmética (Serna, 2005). Por su volumen de producción, el principal derivado del ácido láctico es el polímero biodegradable PLA (ácido poliláctico). Un segundo derivado de importancia creciente es el lactato de etilo, que posee unas excelentes propiedades como disolvente, otros dos derivados de especial interés son el ácido acrílico y el propilénglicol (Wee, 2006)

2. MARCO REFERENCIAL

Para que la producción biotecnológica de ácido láctico sea viable se requiere de materias primas económicas debido a que los productores de polímeros y otros usuarios industriales requieren grandes cantidades de ácido láctico relativamente a bajo costo. Muchos estudios han utilizado materias primas económicas para la producción de ácido láctico, entre las que se destacan materiales celulósicos, granos dañados, licores sulfúricos, sustratos amiláceos disponibles en la forma de desechos agrícolas y porciones comestibles de granos y tubérculos (Serna, 2005). Se han estudiado los parámetros de mayor influencia (temperatura, pH, y concentración de melaza) en la producción de ácido láctico por fermentación discontinua a partir de melaza utilizando *Lactobacillus delbrueckii* NRRL-B-445 (Bautista, 1990).

El glicerol es un sustrato económico debido a su sobreoferta y se ha utilizado en cofermentación con glucosa en varios ensayos para producir ácido láctico (Veiga, 1992; Lüthi, 2002; Pasteris, 2009). Sin embargo pocos artículos se han publicado sobre el uso de glicerol como único recurso de carbono para producir ácido láctico (Duque, 2011). Un ejemplo es el estudio que se realizó del metabolismo de glicerol en *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 donde se obtuvo una producción de 7,11 mM de ácido láctico usando glicerol como única fuente de carbono (Álvarez, 2004).

En 2008 se analizó la degradación del glicerol del mosto del vino en España a partir de cepas nativas de *Lactobacillus sp* halladas en éste. Se obtuvo una máxima producción de ácido láctico de 8,04 mM (Garai, 2008). Estos reportes bibliográficos demuestran que microorganismos del género *Lactobacillus* tienen la

capacidad de degradar glicerol debido a que poseen las enzimas necesarias en su metabolismo y permiten la obtención de ácido láctico como producto mayoritario. Para lograr una mayor producción de ácido láctico a partir de glicerol se realizó en 2010 modificación genética a *Escherichia coli* en la Universidad de Rice Houston Texas, obteniendo un rendimiento de 0,83 g de ácido láctico/g del glicerol a ácido láctico (Mazumdar, 2010). A partir de este informe se pudo entender mejor la ruta metabólica que sigue el glicerol para ser convertido en ácido láctico por métodos biotecnológicos.

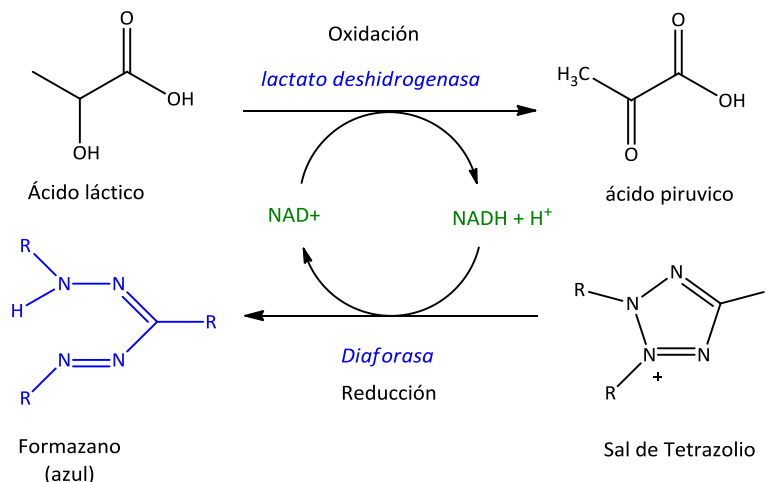
Para la cuantificación de los metabolitos de fermentación del glicerol se ha utilizado ampliamente la técnica de HPLC con detector IR (índice de refracción) y una columna de intercambio catiónico (Aminex HPX-87H) (Garai, 2008). También se ha utilizado la columna SUPELCO-GEL C-610H (30cm x 7,8mm), (Agilent Technologies USA) logrando la separación de los metabolitos glucosa, ácido láctico y glicerol entre otros (Sigma Aldrich). Esta misma columna fue utilizada para la cuantificación de etanol y propanol como productos de fermentación de glicerol bajo las siguientes condiciones de separación: 30 minutos, 60°C, 65 bares flujo de 0,8 mL.min⁻¹ y fase móvil 6 mM H₂SO₄ (Prieto y Rojas, 2011).

Otra técnica de cuantificación utilizada para el análisis de fermentaciones es la Resonancia Magnética Nuclear de protones (¹H-RMN). En el proceso de fermentación del vino se observó por ¹H-RMN etanol y ácidos orgánicos como ácido acético, succínico y láctico. Para esta técnica se recomienda realizar presaturación de la señal del agua como solvente usando una frecuencia de 4,7 ppm para reducir su señal en el espectro (López *et.al* 2009; Clark *et.al* 2006; Lee *et.al.* 2009). Además se reportó en la cuantificación de glicerol, etanol, 1,3 propanodiol y ácidos succínico, láctico y acético entre otros compuestos orgánicos de vinaza empleando N,N-dimetilformamida (DMF) como estándar interno de cuantificación.(Ratanapariyanuch, 2011).

Además de las técnicas analíticas mencionadas existen los métodos enzimáticos que son muy selectivos y de fácil manejo. Algunos laboratorios especializados en la producción de estos *kits* son Roche, Boehringer Mannheim y Merck entre otros. Usando los *kits* específicos (Boehringer Mannheim Inc) para cada compuesto se determinó glucosa, fructosa, glicerol, L-lactato y D-lactato en la asimilación de glicerol por *Lactobacillus collinoides* aislados de cidra (Claisse y Lonvaud, 2000). En el estudio de cofermentación de glicerol-glucosa por *Lactobacillus hilgardii* se utilizaron kits enzimáticos (Boehringer Mannheim Inc) para determinar glicerol, etanol, acetato, D y L-lactato (Pasteris, 2009).

El fundamento teórico del *Kit* de ácido láctico de Merck, se basa en la oxidación del ácido láctico a piruvato mediante la nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD) bajo la acción catalítica de la enzima lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27). La NADH aquí formada, en presencia de la enzima diaforasa (EC 1.6.99.3), reduce una sal de tetrazolio a un formazano azul (**Figura 9**) que se determina reflectométricamente (MERCK chemicals, 2008).

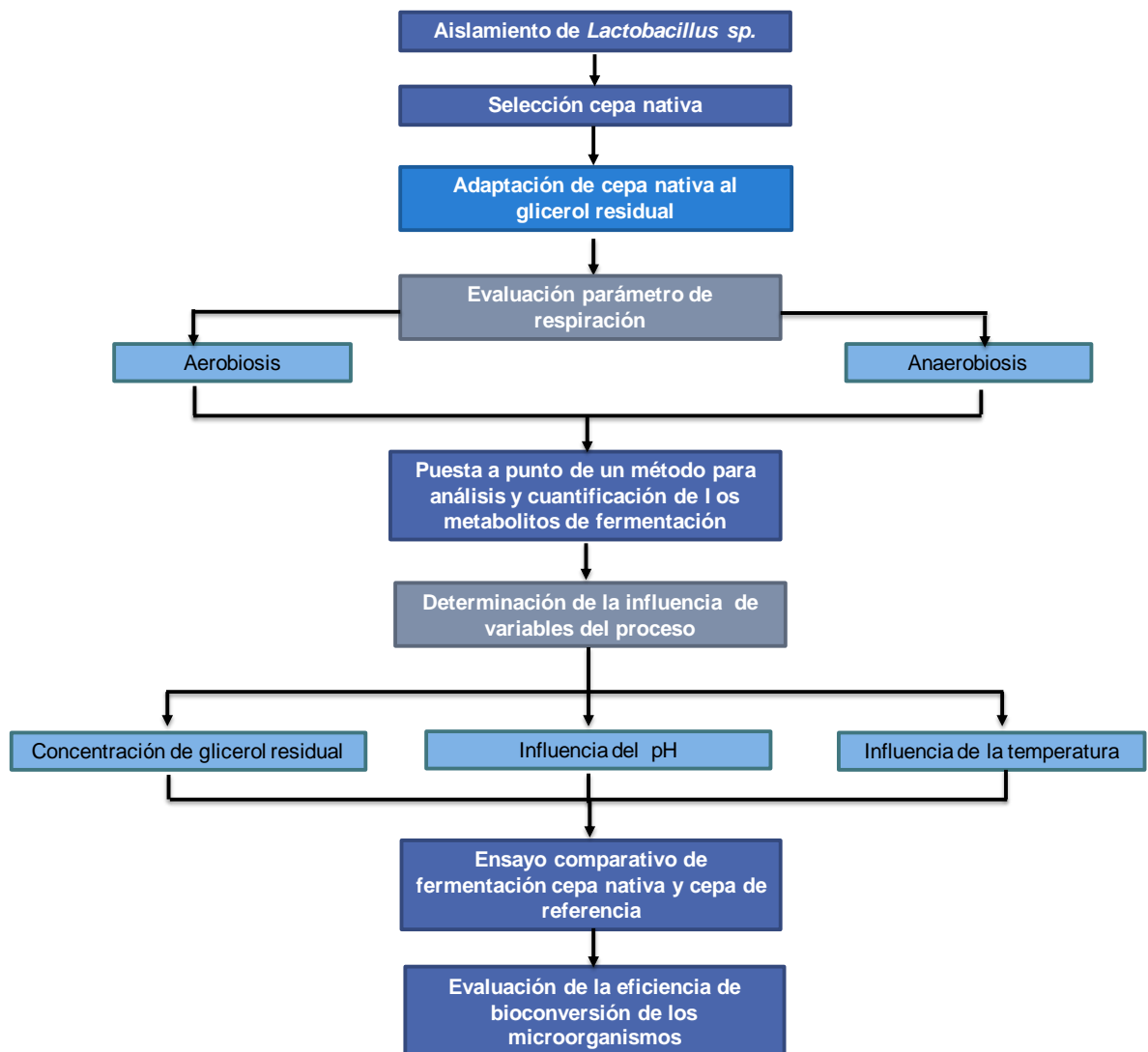
Figura 9. Reacción de ácido láctico en el kit enzimático



DISEÑO METODOLÓGICO

En la **Figura 10** se presenta el esquema de la metodología empleada en el desarrollo del proyecto de investigación.

Figura 10. Esquema de la metodología empleada en la realización del proyecto



3.1. AISLAMIENTO DE *Lactobacillus sp*

El proceso de aislamiento se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la UIS. En esta primera etapa se aislaron cepas nativas de *Lactobacillus sp* de distintas matrices lácteas, de frutas y de verduras. Las muestras se procesaron mediante diluciones seriadas en solución de extracto de proteína (Carlo Erba ® peptona) al 0,1% (p/v).

El aislamiento primario se efectuó en agar Man Rogosa & Sharpe (MRS), cuya composición se especifica en la **Tabla 1**, incubando a 37°C durante 48 horas en condiciones anaerobias. Posteriormente se hizo coloración de Gram (ANEXO B) y prueba de catalasa (ANEXO C) a las colonias de las cepas presuntivas de *Lactobacillus sp* (aspecto blanco lechoso). En total se aislaron 37 cepas y se identificaron del C1 al C37 y se criopreservaron a -80°C (ANEXO D). Estos resultados se reportan en la sección 4.1.

Tabla 1. Composición de agar MRS.

COMPUESTO	CANTIDAD (g/L)
Di-amonio hidrógeno citrato	2,0
Extracto de levadura	4,0
Sulfato de magnesio	0,2
Peptona bacteriológica	10,0
Acetato de sodio	5,0
Extracto de carne	8,0
D(+) glucosa	20,0
Sulfato de manganeso	0,05
Di-potasio hidrógeno fosfato	2,0
Tween 80	1,0
<i>Agar</i>	10,0

Fuente: Cultimed, 2003

3.2. SELECCIÓN DE UNA CEPA NATIVA ASIMILADORA DE GLICEROL CRUDO

Las cepas aisladas en la sección 3.1 fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis, a 37°C, durante 48 horas en caldo MRS cuya fuente de carbono original la glucosa (111,11 mM) fue cambiada por glicerol USP (217,17 mM) y se le adicionó rojo de fenol como indicador. El cambio en la coloración de rojo a amarillo indicó un pH menor de 6,8, es decir producción de ácidos. De las 37 cepas originales se seleccionaron finalmente 8 que fueron las que mostraron mayor cambio de coloración. A estas últimas se les determinó la cantidad de ácido láctico producido por medio del kit enzimático RQflex Reflectómetro® (Merck KGaA, Darmstadt, R.F.A, Alemania) (**Figura 11**). Los resultados se reportan en la sección 4.2.

Figura 11. Kit enzimático RQflex Reflectómetro



Fuente: <http://www.merck-chemicals.com>

3.3. IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA NATIVA SELECCIONADA (*Lactobacillus* CYP4)

La identificación de la especie del microorganismo nativo se realizó mediante pruebas bioquímicas analizando el patrón de fermentación de 13 carbohidratos y 3 alcoholes y comparándolo con los descritos en el manual de Berkeley (Berkeley, 1986) (ANEXO E). Los azúcares empleados fueron: arabinosa, celobiosa,

fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manosa, rhamnosa, ribosa, sacarosa, trealosa y xilosa y los siguientes alcoholes: manitol sorbitol y glicerol. Una coloración amarilla indicó un pH menor de 6,8, es decir producción de ácidos. Finalmente se llevó a cabo la prueba de amonio a partir de arginina y la prueba de crecimiento a 15°C y 40°C para complementar la identificación presuntiva. Los resultados se reportan en la sección 4.3.

En esta etapa se evaluó el consumo de glucosa por duplicado en medio anaeróbico a las 24 horas de fermentación para detectar la producción de ácido láctico y corroborar el género *Lactobacillus*. El medio contenía 20g/L de glucosa de acuerdo a la composición del medio MRS lo cual corresponde a 111,11 mM. El análisis cuantitativo se realizó por HPLC.

3.4. ADAPTACIÓN DE *Lactobacillus* CYP4 AL GLICEROL CRUDO

Se evaluó el crecimiento del *Lactobacillus* CYP4 en condiciones de anaerobiosis a 37°C a diez concentraciones diferentes de glicerol USP y crudo entre 54,29 mM y 868,68 mM. Se midió la densidad óptica (D.O) a 540 nm en espectrofotómetro TERMO 4001/4 de GENESYS a las 24, 48 y 72 horas. Las concentraciones de glicerol crudo donde se observó mayor crecimiento fueron 217,17 mM, 542,92 mM y 760,09 mM. Los resultados se reportan en la sección 4.4.

Posteriormente la cepa se repicó 10 veces en agar MRS modificado con glicerol crudo a la concentración 217,17 mM. El glicerol crudo (**Figura 12**) se obtuvo de la empresa Colombiana BIO D de Facatativa – Cundinamarca (muestra P1001) y su caracterización fisicoquímica (Cancino y Gómez, 2011) se reporta en la **Tabla 2**.

Los repiques se hicieron en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, alternados con repiques en caldo MRS modificado con glicerol crudo a la misma concentración. El monitoreo de la adaptación se determinó según el tiempo requerido para crecer, la

morfología y tamaño de las colonias, coloración de Gram y prueba de catalasa. Paralelamente la cepa se mantuvo en agar MRS con glucosa repicándola periódicamente para evitar su muerte y se criopreservó a -80°C en tubos eppendorf estériles. Los resultados se reportan en la sección 4.4.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del glicerol crudo empleado

PARÁMETRO FÍSICOQUÍMICO		MÉTODO	Ref. P1001
pH		pH-metro	$4,37 \pm 0,02$
Densidad		picnómetro	$1,06 \pm 0,01$
% Glicerol		HPLC-RI	$49,33 \pm 5,87$
% Humedad		Titulación Karl Fischer	$38,2 \pm 0,04$
% Cenizas		Calcinación	$2,62 \pm 0,31$
MONG	% Metanol	HPLC-RI	$4,41 \pm 0,14$
	% Jabones	Titulación colorimétrica	No detectado
	% OMO	Balance de masa	9,85

Fuente: Cancino y Gomez 2011

Figura 12. Glicerol crudo de la industria Bio-D



Fuente: Los autores

3.5. EVALUACIÓN DEL PARÁMETRO DE RESPIRACIÓN DE *Lactobacillus* CYP4

Después de lograr la adaptación del microorganismo al glicerol crudo se efectuó la curva de crecimiento tomando mediciones de densidad óptica (D.O) a 540 nm cada 3 horas durante 12 horas y una medición final luego de 24 horas. Este ensayo se ejecutó en botellas de vidrio de 500 mL con volumen de operación de 200 mL, manteniendo una proporción de inóculo al 10% (2 mL:200 mL), incubando a 37°C y agitando a 200 rpm en agitador orbital HEIDOLPH UNIMAX 1010. Los ensayos se realizaron por triplicado.

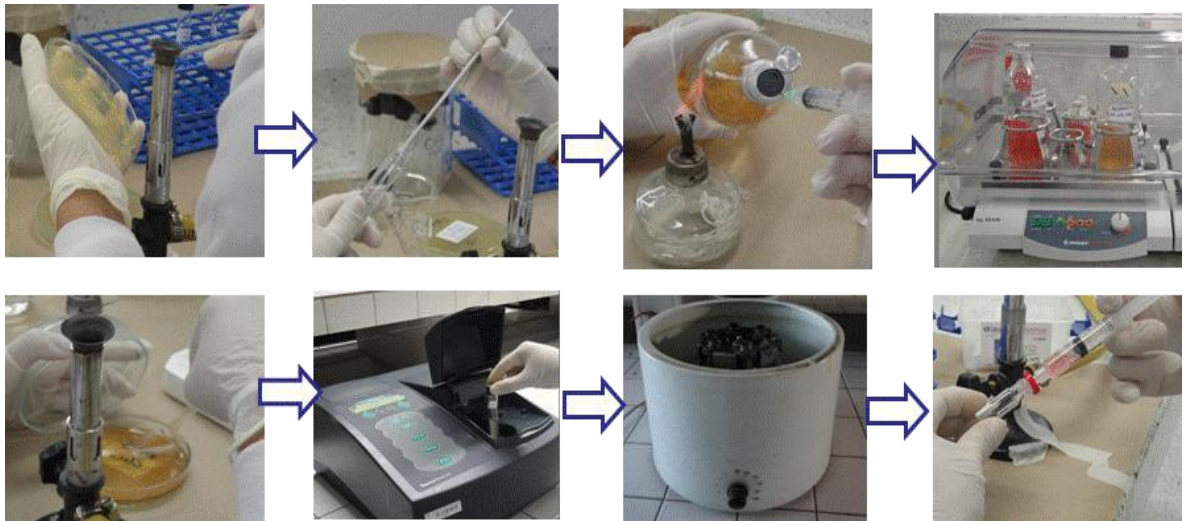
La curva de crecimiento se realizó tanto en aerobiosis como en anaerobiosis para comprobar la atmósfera ideal de crecimiento. La preparación del medio anaeróbico se efectuó en la cámara de anaerobiosis (**Figura 13**), empleando nitrógeno gaseoso y adicionando al medio de cultivo HCl-cisteína, resazurina y NaHCO₃ como agentes reductores de oxígeno.

Figura 13. Cámara de anaerobiosis



Las muestras obtenidas en cada medición se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se filtró con membranas de PVDF (di-fluoruro de polivinilideno, 0,45 µm) OlimPeak y se preservó a 4°C (**Figura 14**). El posterior análisis de metabolitos se realizó por HPLC. Los resultados se reportan en la sección 4.5.

Figura 14. Esquema de trabajo para la elaboración de curva de crecimiento del microorganismo en medio aeróbico y anaeróbico.



3.6. EFECTO DE LAS VARIABLES FISICOQUÍMICAS EN EL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus* CYP4

Una vez se logró la adaptación de *Lactobacillus* CYP4 se evaluaron la concentración de glicerol crudo, temperatura y pH en condiciones de anaerobiosis en búsqueda de los valores donde se presentaba mayor crecimiento de la cepa. La variable de respuesta fue la densidad óptica (D.O) a 540 nm.

Primero manteniendo la concentración de glicerol crudo a 217,17mM y el pH a 6,3, se evaluaron las temperaturas (25°C, 37°C y 42°C). El mayor crecimiento se obtuvo a 37°C. Luego manteniendo constante la concentración de glicerol crudo en 217,17 mM y la temperatura en 37°C, se evaluaron los valores de pH (4,5, 5,5 y 6,5) mediante la adición de H₃PO₄ 1,5M o de NaOH 2M. El mayor crecimiento se obtuvo a pH 5,5. Por último se evaluaron las concentraciones de glicerol crudo (217,17 mM, 542,92 mM y 760,09mM) manteniendo constante la temperatura a 37°C y el pH a 5,5. Se observó mayor crecimiento a 217,17 mM de glicerol crudo.

Todos los ensayos se ejecutaron en botellas de vidrio de 50 mL con volumen de operación de 20 mL (**Figura 15**), manteniendo una proporción de inóculo al 10% (2 μ L:20 mL) y agitación de 200 rpm. Los resultados se reportan en la sección 4.6.

Figura 15. Ensayo destructivo de evaluación de temperatura, concentración de glicerol crudo y pH del medio



3.7. ENSAYO DE FERMENTACIÓN DE CEPA NATIVA Y COMPARACIÓN CON CEPA DE REFERENCIA

Inicialmente el crecimiento de la cepa de referencia *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 fue evaluado en anaerobiosis y aerobiosis como se describe en la sección 3.5. Para el ensayo final de fermentación, la cepa nativa y de referencia fueron sometidas a una adaptación previa con el fin de alcanzar la fase de crecimiento exponencial (obtención de preinóculo). *Lactobacillus* CYP4 se incubó en anaerobiosis y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 en aerobiosis durante 10 horas a 37°C y agitación de 200 rpm

El ensayo de fermentación se realizó por réplicas para la cepa *Lactobacillus* CYP4 en botellas (tres para cada tiempo) de 50 mL con volumen de operación de 20 mL siguiendo la proporción de preinóculo al 10% (200 μ L:20 mL). Las botellas se incubaron en anaerobiosis a 37°C, pH 5,5, concentración de glicerol crudo 217,17 mM y agitación de 200 rpm. Se tomaron mediciones de densidad óptica (D.O) a 540nm a las 0, 6, 9, 12 y 24 horas. Para comprobar el número de UFC/mL a tiempo cero para cada una de las cepas se efectuó la técnica de “Recuento en placa” en agar MRS con glucosa. La fermentación de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que

Lactobacillus CYP4, sin embargo se incubó en aerobiosis y no se realizó el ensayo de fermentación por replicas sino que a cada tiempo de fermentación se tomaron tres medidas de sobrenadante.

Las muestras obtenidas en cada medición se centrifugaron a 2000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante se filtró con membrana de PVDF (0,45 μm) y se preservó a 4°C para el posterior análisis por $^1\text{H-RMN}$. Los resultados se reportan en la sección 4.7.

3.8. CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS DE FERMENTACIÓN

La cuantificación y análisis de metabolitos, tanto cualitativa como cuantitativamente, se realizó mediante dos técnicas analíticas: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) y Resonancia Magnética Nuclear ($^1\text{H-RMN}$).

3.8.1. Análisis de metabolitos por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

El sobrenadante recuperado de la centrifugación del cultivo de *Lactobacillus* CYP4 se analizó en un cromatógrafo líquido Agilent technologies 1100, con detector índice de refracción (RID) Agilent technologies 1220. Se empleó una columna Supelcogel TM C610-H a 60°C, utilizando como fase móvil una solución de ácido sulfúrico 6 mM y con un flujo de 0,8 mL/min. Además, se utilizó como fase móvil una solución 0,1N de ácido fosfórico, a 70°C. De cada una de las muestras fueron inyectados 25 μL , previa filtración con una membrana de PVDF (0,45 μm). La cuantificación se llevó a cabo mediante curvas de calibración para los siguientes compuestos: glucosa, glicerol, ácido láctico racémico, ácido acético, etanol, 1,3-propanodiol y butanol (ANEXO F). Los resultados se reportan en las secciones 4.3 y 4.5.2.

3.8.2. Análisis de metabolitos por Resonancia Magnética Nuclear (^1H -RMN)

Los metabolitos obtenidos en la fermentación de glicerol, fueron determinados mediante análisis de protones por ^1H -RMN en el equipo *Bruker Avance de 400 MHz*. Las mediciones se realizaron con la secuencia de pulsos Zg 30° con intervalos de 0,5 segundos entre “scans” y los espectros se archivaron con ocho scans o barridas. Se realizó presaturación del solvente (agua) a la frecuencia de 4,7 ppm para reducir considerablemente su intensidad en el espectro, utilizando la secuencia de pulsos Zgpr.

La selección del estándar interno se realizó teniendo en cuenta que su espectro tenga pocas señales y cuyo desplazamiento químico (δ , ppm) no interfiera en la zona de integración de las señales de glicerol, ácido láctico, ácido acético y etanol; por otra parte que sea soluble en agua, estable, no volátil y además de fácil adquisición.

Se tomó el espectro de ^1H -RMN de los compuestos grado analítico de etanol, ácido acético, N, N-dimetilformamida, ácido láctico racémico, además del glicerol crudo y mezcla equimolar de glicerol crudo y ácido láctico. El medio de cultivo con glicerol crudo se fue contaminando en cantidades crecientes de ácido láctico para determinar su desplazamiento químico (δ , ppm) en el espectro.

Para la determinación analítica de los metabolitos de fermentación se mezclaron 450 μL de sobrenadante (punto 3.7) con 150 μL de agua deuterada (D_2O , 99,8% Merck) y 110 μL de N, N-dimetilformamida (DMF) 0,1 M como estándar interno de cuantificación de metabolitos.

Una vez se obtuvo la FID se procesó en el programa Mestrenova 7.1.0 aplicando la transformada de Fourier para obtener el gráfico dependiente de la frecuencia. A continuación se corrigió la línea base y se asignó la escala con respecto a la señal del agua la cual se ubicó a 4,79 ppm. La señal patrón para la cuantificación fue el protón amídico de la N, N-dimetilformamida en 7,84 ppm y se le dio un valor de

integración de 1. Los espectros fueron procesados por medio del software Mestec Nova 7.1.0. Los resultados de la cuantificación se reportan en la sección 4.7.3.

3.9. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE BIOCONVERSIÓN DE GLICEROL

Con el fin de evaluar la producción de metabolitos se tuvieron en cuenta tres criterios que relacionan la cantidad de sustrato consumido: el porcentaje de rendimiento de la reacción, el porcentaje de conversión y productividad volumétrica. Los resultados se reportan en la sección 4.8.

3.9.1. Porcentaje de conversión de glicerol

La conversión de la reacción es la cantidad de glicerol consumido ($Glicerol_x$), dividido entre la cantidad de glicerol inicial ($Glicerol_i$)(Serna y Naranjo, 2005) como se observa en la **Ecuación 1**.

$$\% CG = \frac{Glicerol_i - Glicerol_x}{Glicerol_i} * 100$$

Ecuación 1. Porcentaje de conversión de glicerol

3.9.2. Rendimiento de la reacción (g/g)

El rendimiento de la reacción se calculó con base en la cantidad de ácido láctico producido en la fermentación sobre la cantidad de glicerol consumido en la misma (Serna y Naranjo, 2005). El cálculo de este parámetro está definido por la **Ecuación 2**.

$$Y'_{ps} = \frac{\text{Ácido Láctico producido (g)}}{\text{Glicerol consumido (g)}}$$

Ecuación 2. Porcentaje de rendimiento.

3.9.3. Productividad volumétrica (g/L.h)

De acuerdo con la **Ecuación 3**, la productividad volumétrica está definida como los gramos de ácido láctico producidos por unidad de volumen, en un tiempo dado.

$$Q = \frac{\textit{Gramos de Ácido Láctico producidos}}{\textit{Tiempo de fermentación * Volumen}}$$

Ecuación 3. Productividad volumétrica.

4. RESULTADOS

4.1. AISLAMIENTO DE *Lactobacillus sp.*

Se aislaron 37 cepas en medio selectivo MRS para el género *Lactobacillus*. Todas las cepas fueron Gram (+) y catalasa negativa puesto que no poseen esta enzima (EC. 1.11.1.6). Las fuentes de aislamiento de los microorganismos se observa en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Cepas de *Lactobacillus sp* aisladas de lácteos, frutas y verduras.

CEPA	FUENTE	CEPA	FUENTE	CEPA	FUENTE
C1	Regeneris	C14	Yogurt	C26	Tomate
C2	Regeneris	C15	Tomate	C27	Tomate
C3	Regeneris	C16	Tomate	C28	Mango
C4	Queso hoja	C17	Brócoli	C29	Mandarina
C5	Queso crema	C18	Brócoli	C30	Mandarina
C6	Yox	C19	Durazno	C31	Mandarina
C7	Kumis	C20	Durazno	C32	Fresa
C8	Kumis	C21	Leche	C33	Fresa
C9	Yogurt	C22	Coliflor	C34	Mango
C10	Activia	C23	Salpicón	C35	Mango
C11	Queso hoja	C24	Pepino	C36	Manzana
C12	Kumis	C25	Leche	C37	Manzana
C13	Yogurt				

4.2. SELECCIÓN DE UNA CEPA NATIVA ASIMILADORA DE GLICEROL CRUDO

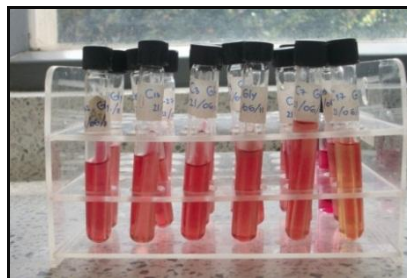
Al realizar la fermentación de glicerol USP se concluyó que 16 de las 37 cepas nativas de *Lactobacillus sp* asimilaron el glicerol como fuente de carbono produciendo ácidos orgánicos ya que hubo un resultado positivo en el cambio de coloración de rojo a amarillo (**Figura 16**). En la **Tabla 4** se reporta (-) donde no

hubo cambio de coloración, (+) donde hubo cambio de coloración y (++) donde se observó mayor intensidad de coloración.

Tabla 4. Resultados prueba de fermentación de glicerol USP para las cepas *Lactobacillus sp* seleccionadas

CEPA	RESULTADO	CEPA	RESULTADO	CEPA	RESULTADO
C1	-	C14	-	C27	++
C2	-	C15	-	C28	++
C3	+	C16	-	C29	-
C4	++	C17	++	C30	-
C5	-	C18	+	C31	-
C6	-	C19	-	C32	+
C7	+	C20	-	C33	++
C8	++	C21	-	C34	++
C9	-	C22	-	C35	+
C10	++	C23	-	C36	-
C11	-	C24	+	C37	-
C12	-	C25	-		
C13	+	C26	+		

Figura 16. Cambio de coloración por asimilación de glicerol USP como fuente de carbono y producción de ácidos orgánicos



A las ocho cepas que dieron resultado doblemente positivo (**Tabla 4**) se les midió la concentración de ácido láctico empleando el kit reflectométrico de Merck, los resultados se encuentran en la **Tabla 5**. Utilizando la **Ecuación 4** se reportaron los datos en concentración mM.

Tabla 5. Resultados medición de ácido láctico a partir de glicerol USP para las cepas *Lactobacillus sp* seleccionadas

CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO								
A.L (Ácido láctico)	C4	C8	C10	C17	C27	C28	C33	C34
(g/L)	0,97	0,81	0,61	0,55	0,70	0,72	0,58	0,52
(mM)	10,71	8,99	6,771	7,27	7,77	7,937	6,44	5,71

$$0,965 \frac{g}{L} * \frac{1mol}{90,08g} * \frac{1000mmoles}{1mol} = 10,71 \frac{mmoles}{L}$$

Ecuación 4. Fórmula de conversión de g/L a mM de ácido láctico.

De acuerdo con la **Tabla 5** la cepa C4 (la cual se designó como ***Lactobacillus CYP4***) fue la mayor productora de ácido láctico, razón por la cual se seleccionó para las pruebas posteriores de adaptación al glicerol crudo.

4.3. IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA NATIVA SELECCIONADA

La cepa *Lactobacillus CYP4* se identificó presuntivamente. La especie no se reporta por razones de propiedad intelectual. Para corroborar el género *Lactobacillus* se realizó una fermentación anaeróbica de glucosa a 24 horas y se determinó su concentración por HPLC.

En el cromatograma del blanco de fermentación anaeróbica la glucosa eluye a 7,94 minutos, a los 8,47 minutos eluye otro componente no identificado. El área de la glucosa es 452,201 nRIU proporcional a una concentración de 90,51 mM. Cabe anotar que la presencia del otro compuesto eluido después de la glucosa dificulta su cuantificación por estar solapados y por ende se aleja del valor teórico que es 111,11mM. La banda del ácido acético eluye a los 12,29 minutos con un área de 614,699 nRIU correspondiente a una concentración de 55,14 Mm. Después de 24 horas de fermentación se cuantificaron 6,33 mM de glucosa que corresponde a un

consumo de 84,2 mM, se incrementó el ácido acético a 2 mM y apareció el ácido láctico con una concentración de 99,79 mM y el etanol con 57,74 mM (**Tabla 6**).

El cromatograma blanco de fermentación anaeróbica y los cromatogramas de las fermentaciones de glucosa a las 24 horas por duplicado, se reportan en el ANEXO G.

Tabla 6. Metabolitos de fermentación anaeróbica de glucosa por *Lactobacillus* CYP4

COMPUESTO (mM)	BLANCO	MEDICIONES		PROMEDIO
Glucosa	90,53	84,16	84,24	84,2*
Ácido Láctico	0,00	103,96	95,64	99,79
Ácido Acético	55,14	56,63	58,40	57,52
Etanol	0,00	57,29	58,18	57,74

*Los datos se reportaron como glucosa consumida

De acuerdo con las fermentaciones, se corrobora que *Lactobacillus* CYP4 es una especie heterofermentadora, siendo su principal producto de fermentación a partir de la glucosa el ácido láctico, seguido de etanol y en pequeñas cantidades de ácido acético. Además, se concluye que en anaerobiosis logra convertir la glucosa a ácido láctico con un rendimiento del 59% g/g y en etanol con un rendimiento del 17,55% g/g.

4.4. ADAPTACIÓN DE *Lactobacillus* CYP4 AL GLICEROL CRUDO

La cepa *Lactobacillus* CYP4 presentó un bajo crecimiento en medio con glicerol USP en condiciones anaeróbicas como se observa en la **Figura 17**. Alcanzó una densidad óptica de 0,21 a las 24 horas. En condiciones aeróbicas no se observó crecimiento.

No obstante, cuando se realizó la siembra en un medio con glicerol crudo se observó mayor tolerancia a este nuevo sustrato. Como se observa en la **Figura**

18, para todos los tiempos y concentraciones evaluados, el microorganismo toleró mejor el glicerol crudo que el glicerol USP. El mayor crecimiento se observó a una concentración de 217,17 mM de glicerol crudo, la cual fue seleccionada esta concentración para realizar el proceso de adaptación.

Figura 17. Curva de crecimiento anaeróbica en glicerol USP de *Lactobacillus* CYP4 sin adaptación

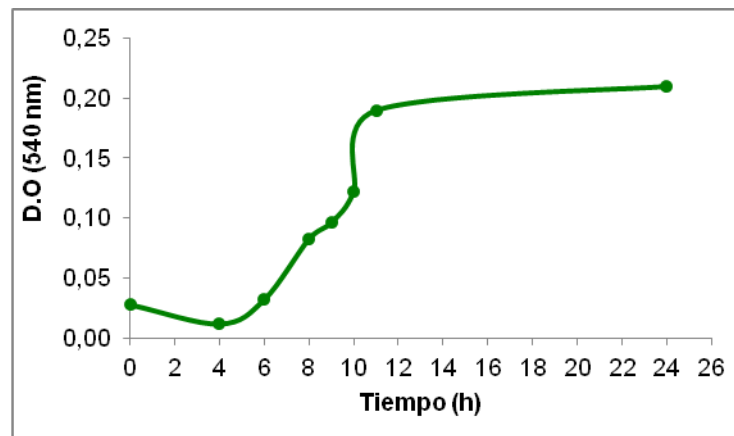
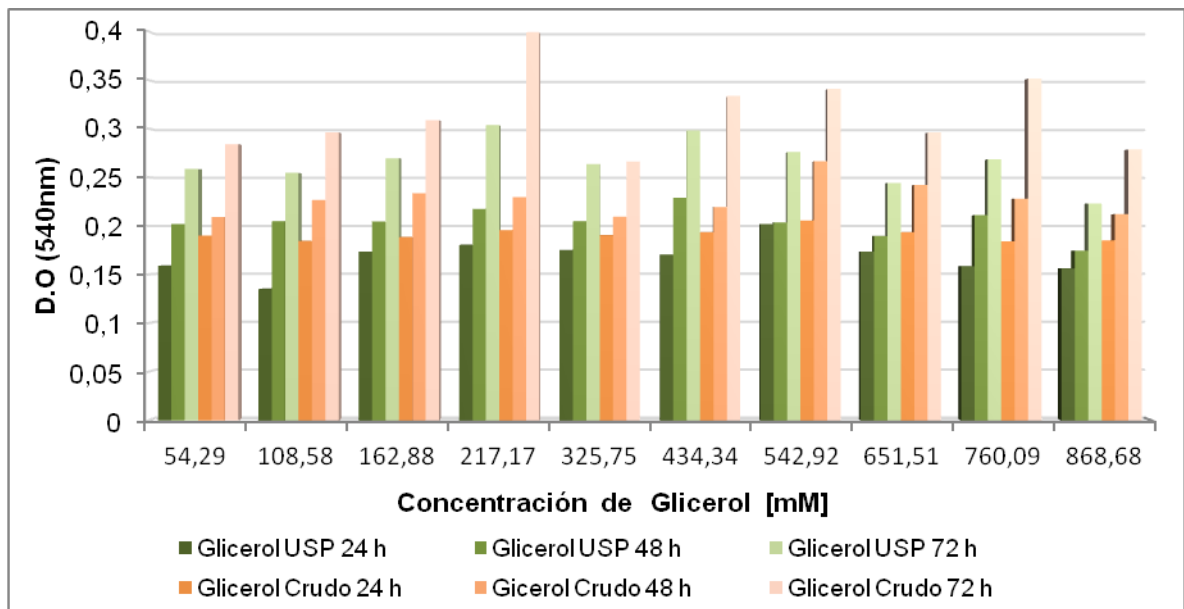
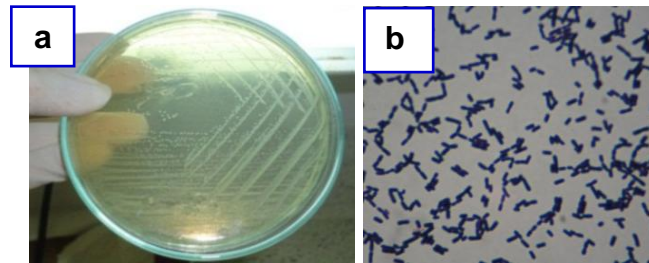


Figura 18. Crecimiento de *Lactobacillus* CYP4 a diferentes concentraciones de glicerol USP y crudo



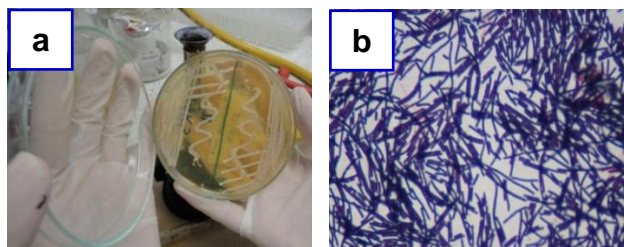
Después de diez repiques, *Lactobacillus* CYP4 logró adaptarse al glicerol crudo formando colonias pequeñas de color blanco (**Figura 19 a**), las cuales en tinción de Gram se observaron como cadenas de cocobacilos (**Figura 19 b**).

Figura 19. Colonias de *Lactobacillus* CYP4 en glicerol crudo (a) y su coloración de Gram (b)



Con cada repique en agar MRS modificado con glicerol crudo, fue mejorando el crecimiento de la cepa *Lactobacillus* CYP4. La atmósfera anaeróbica favoreció su crecimiento. Inicialmente la cepa requería por lo menos de 48 horas para crecer, luego del quinto pase, este tiempo disminuyó a 24 horas y fue disminuyendo progresivamente hasta requerir sólo 12 horas de incubación para alcanzar su fase de crecimiento estacionaria. Paralelamente se repicó en glucosa para conservarla, formando grandes colonias de color blanco (**Figura 20.a**). El efecto adverso que supone el cambio de fuente de carbono se evidenció en la coloración de Gram con un cambio de la morfología de bacilos largos (**Figura 20.b**) a cocobacilos Gram positivos (**Figura 19.b**). La prueba de catalasa continuó siendo negativa sin importar el número de repiques a los que se sometió.

Figura 20. Colonias de *Lactobacillus* CYP4 en glucosa (a) y su coloración de Gram (b)

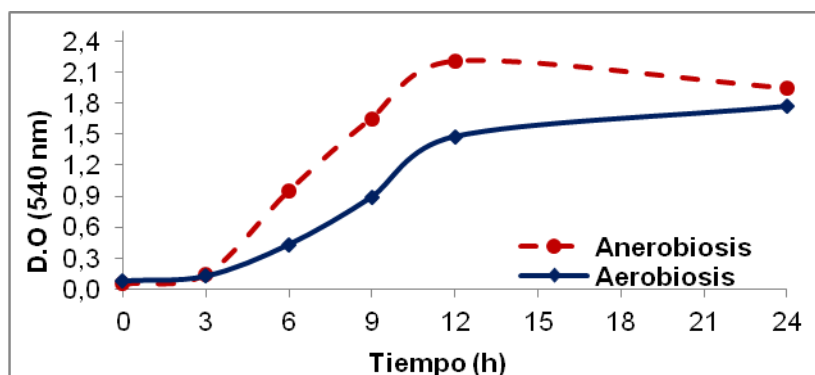


4.5. EVALUACIÓN DEL PARÁMETRO DE RESPIRACIÓN DE *Lactobacillus* CYP4

4.5.1. Curva de crecimiento aeróbica y anaeróbica de *Lactobacillus* CYP4 en glicerol crudo

La cepa *Lactobacillus* CYP4 logró crecer tanto en aerobiosis como en anaerobiosis por lo cual se corrobora como un microorganismo anaerobio facultativo. Como se observa en la **Figura 21** presentó una fase retardo o latencia de 3 horas, donde el microorganismo se adaptó al glicerol crudo como nueva fuente de carbono y a las condiciones fisicoquímicas del proceso. Posteriormente, en anaerobiosis ocurrió la fase exponencial con una duración de 9 horas donde se incrementó el número de células del microorganismo, para luego entrar en la fase estacionaria a las 12 horas de incubación. Se observó un mayor crecimiento en medio de anaerobiosis y en menor tiempo (12h, D.O.:2,21) debido a que el género *Lactobacillus* es principalmente anaeróbico facultativo (Benavides, 2008). El bajo crecimiento en aerobiosis se puede relacionar con una condición de oxígeno-stress cuyo alto costo energético es mayor que los beneficios en términos de ATP necesarios para la actividad enzimática (Teusink *et al.*, 2009). Por lo anterior se concluye que al microorganismo le favorece más un ambiente anaeróbico para su crecimiento.

Figura 21. Curva de crecimiento aeróbica y anaeróbica de *Lactobacillus* CYP 4 en glicerol crudo



4.5.2. Cuantificación de metabolitos por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

4.5.3. Fermentación aeróbica de glicerol crudo por *Lactobacillus* CYP4

En el cromatograma usado como blanco de fermentación aeróbica se observó una banda a 10,74 minutos correspondiente a la elución del glicerol con un área de $5,07 \cdot 10^6$ nRIU proporcional a una concentración de 213,04 mM y otra banda a 12,03 minutos correspondiente a la elución del ácido acético presente en la muestra con un área de 641,17 nRIU proporcional a una concentración de 57,49 mM. Después de 24 horas de fermentación se consumieron 27,84 mM de glicerol crudo, se incrementó el ácido acético en 4,77 mM, apareció el ácido láctico con una concentración de 43,87 mM y el etanol con 17,96 mM (**Tabla 7**). El cromatograma blanco de fermentación aeróbica y los cromatogramas de las fermentaciones de glicerol crudo a 24 horas por duplicado, se reportaron en el ANEXO I.

4.5.4. Fermentación anaeróbica de glicerol crudo por *Lactobacillus* CYP4

En el cromatograma usado como blanco de fermentación anaeróbica se observó una banda a 10,73 minutos correspondiente a la elución del glicerol con un área de $4,34 \cdot 10^6$ unidades proporcional a una concentración de 216,30 mM y otra banda a 12,04 minutos correspondiente a la elución del ácido acético presente en la muestra con un área de 603,70 unidades proporcional a una concentración de 54,12 mM. Después de 24 horas de fermentación se consumieron 56,74 mM de glicerol crudo, no hay presencia de ácido acético, apareció ácido láctico racémico con una concentración de 46,94 mM y etanol con 49,65 mM (**Tabla 7**). El cromatograma blanco de fermentación anaeróbica y los cromatogramas de las fermentaciones de glicerol crudo a 24 horas por duplicado, se reportaron en el ANEXO H

Tabla 7. Metabolitos de fermentación aeróbica y anaeróbica de glicerol crudo por *Lactobacillus* CYP4 a las 24 horas

Compuesto	AEROBIOSIS (mM)			ANAEROBIOSIS (mM)				
	Blanco	Medidas	PROM	Blanco	Medidas	PROM		
Glicerol	213,04	29,12	26,55	27,84	216,30	55,86	57,62	56,74
Ácido Láctico	0	40,38	47,37	43,87	0	46,58	47,30	46,94
Ácido Acético	57,49	59,06	65,45	62,26	54,12	53,51	53,80	53,66
Etanol	0	20,25	15,66	17,96	0	51,15	48,15	49,65

*Los datos se reportaron como glicerol consumido

De acuerdo con los resultados obtenidos en la **Tabla 7** la producción de ácido láctico fue similar en las dos condiciones con un valor de aproximadamente (45 mM) y se produjo más etanol anaeróbicamente (49,65 mM) en comparación con el medio aeróbico (17,46 mM).

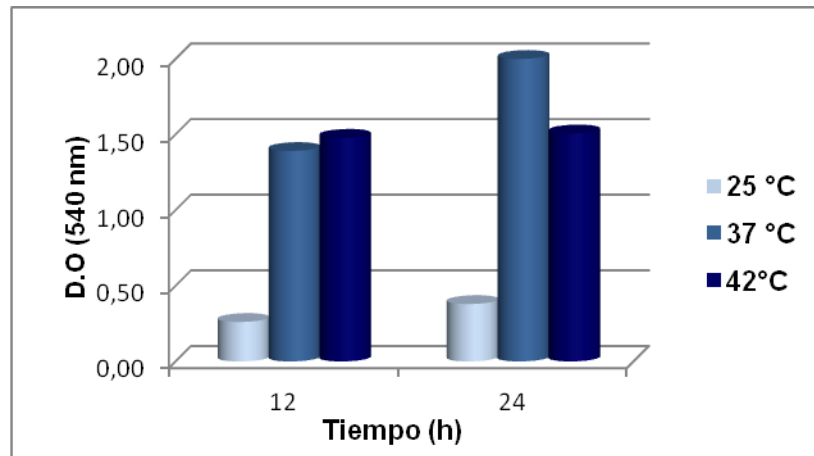
También se observó un mayor consumo de glicerol crudo en anaerobiosis (57,74 mM) en comparación con el medio aeróbico (27,84 mM), razón por la cual se seleccionó ésta condición para las posteriores fermentaciones con la ventaja de producir además de ácido láctico, un alcohol de alto interés industrial como lo es el etanol.

4.6. EFECTO DE LAS VARIABLES FISICOQUÍMICAS EN EL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus* CYP4

4.6.1. Efecto de la temperatura

A las 24 horas y a 37°C se obtuvo mayor crecimiento como se observa en la **Figura 22**. El crecimiento observado a 37°C corrobora que *Lactobacillus* CYP4 es un microorganismo mesófilo con una temperatura óptima de 37°C (Frioni, 1999).

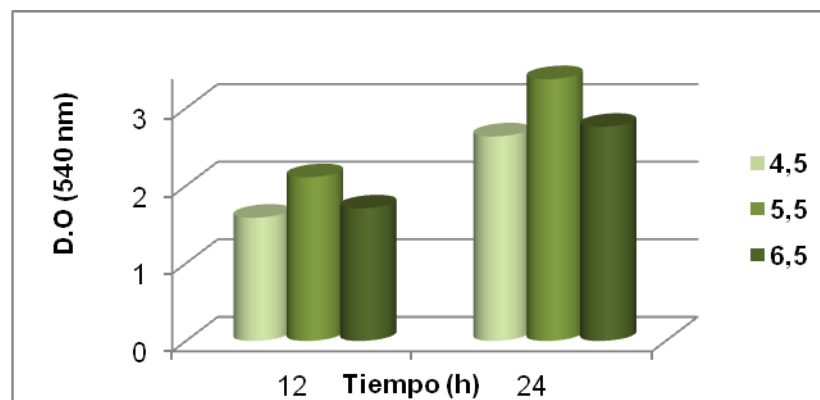
Figura 22. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Lactobacillus* CYP4 en glicerol crudo



4.6.2. Efecto del pH

Para este ensayo se mantuvieron constantes la temperatura a 37°C y la concentración de glicerol crudo de 217,17 mM. De acuerdo con los resultados observados en la **Figura 23** se escogió como valor óptimo de pH 5,5, con los mayores valores de densidad óptica tanto a las 12 horas (D.O.: 2,11) como a las 24 horas (D.O.: 3,37). Esto coincide con el crecimiento óptimo reportado en la literatura para el género *Lactobacillus* (Valdez, *et al.*, 1997).

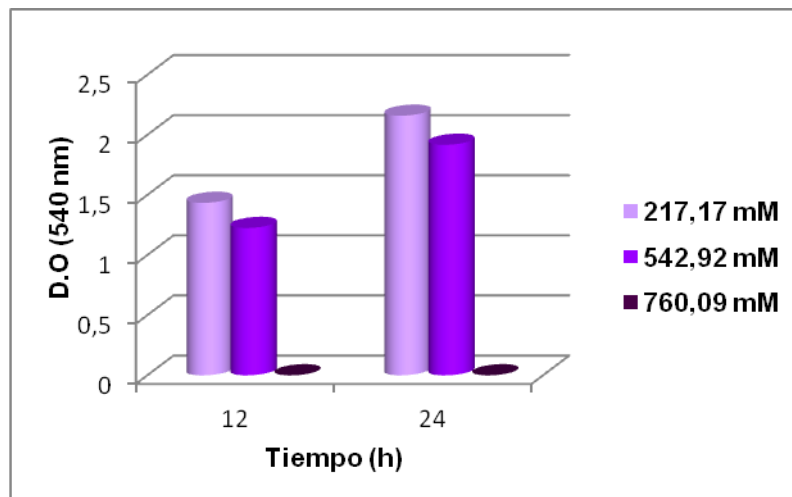
Figura 23. Efecto del pH en el crecimiento de *Lactobacillus* CYP4 en glicerol crudo.



4.6.3. Efecto de la concentración de glicerol crudo

Para este ensayo se mantuvieron constantes la temperatura a 37°C y el pH 5,5. De acuerdo a la **Figura 24**, se observó que a las 12 horas (D.O.: 1,43) y a las 24 horas (D.O.: 2,16) de fermentación el crecimiento es más alto a 217,17 mM (20 g/L) de glicerol crudo en comparación con 542,92 mM (50 g/L). También se concluye que la concentración de 760,09 mM (70 g/L) es letal para *Lactobacillus* CYP4, inhibiendo totalmente su crecimiento.

Figura 24. Efecto de la concentración de glicerol crudo en el crecimiento de *Lactobacillus* CYP4



De estos ensayos se concluye que las mejores condiciones de crecimiento para la cepa *Lactobacillus* CYP4 son: temperatura de 37°C, pH 5,5, concentración de glicerol crudo 217,17 mM. La atmosfera anaerobica favoreció el desarrollo de la cepa en menor tiempo. Puesto que el crecimiento de un microorganismo es directamente proporcional a la producción de metabolitos bajo estas condiciones se analizó la producción de ácido láctico racémico.

4.7. ENSAYO DE FERMENTACIÓN DE CEPA NATIVA Y COMPARACIÓN CON CEPA DE REFERENCIA

4.7.1. Curva de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469

Según los resultados de la **Figura 25**, el microorganismo tardó 3 horas para la adaptación a la nueva fuente de carbono. La mejor condición de crecimiento para *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 es la aerobiosis (D.O.: 0,80) comparada con la anaerobiosis (D.O.: 0,49). Álvarez *et al.*, 2004, encontró que *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 (**Figura 26**) logró asimilar mejor el glicerol como única fuente de carbono en condiciones anaeróbicas (D.O.: 1,1).

Figura 25. Curva de crecimiento aeróbica y anaeróbica de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 en glicerol crudo

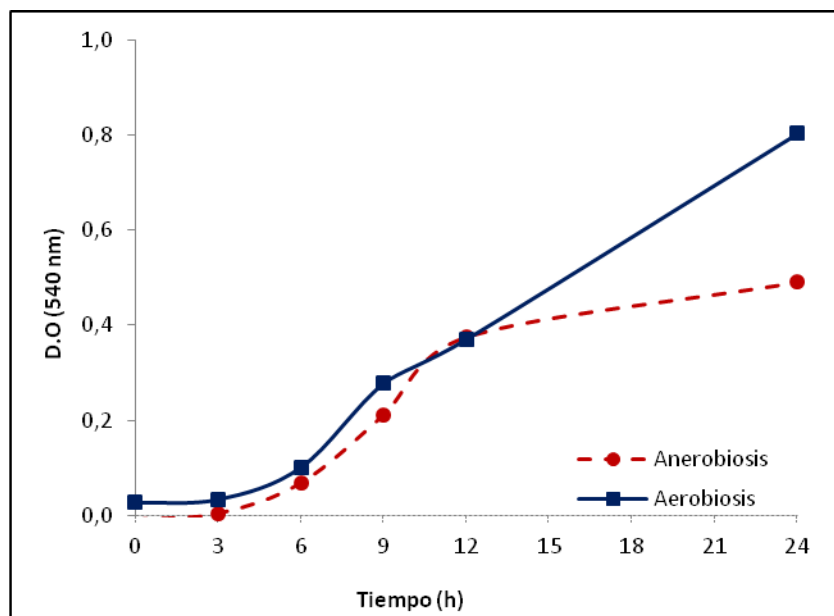
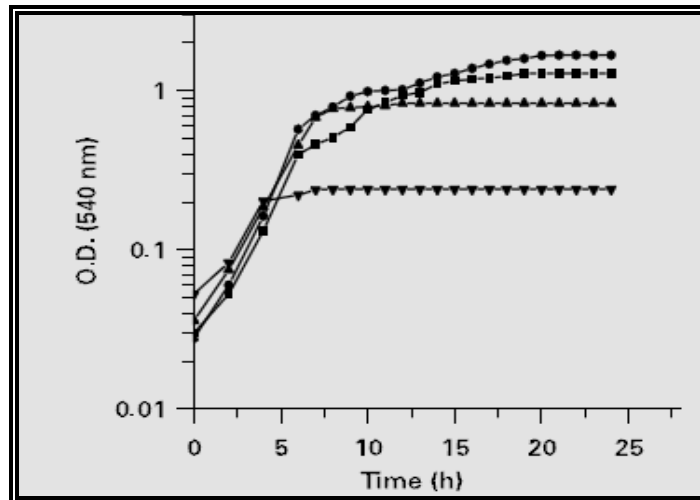


Figura 26. Curva de crecimiento aeróbica de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 en glicerol USP



- Crecimiento aeróbico en glicerol como única fuente de carbono

Fuente: Álvarez 2004

4.7.2. Ensayo comparativo de fermentación *Lactobacillus* CYP4 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

La **Figura 27** muestra el crecimiento de *Lactobacillus* CYP4 en anaerobiosis y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 en aerobiosis. El metabolismo de *Lactobacillus* CYP4 fue más rápido que el metabolismo de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 puesto que a las 6 horas ya presentaba una densidad óptica de 0,965 mientras que *Lactobacillus rhamnosus* 0,231.

El recuento de colonias al tiempo de cero horas (**Figura 28. a**) fue útil para garantizar que los dos ensayos iniciaran la fermentación con una cantidad similar de unidades formadoras de colonia (UFC) (**Figura 28. b**) en este caso $5,7 \times 10^7$ UFC/mL para *Lactobacillus* CYP4 y $5,9 \times 10^7$ UFC/mL para *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 como se observa en la **Tabla 8**.

Figura 27. Ensayo comparativo de fermentación de *Lactobacillus* CYP4 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 en glicerol crudo

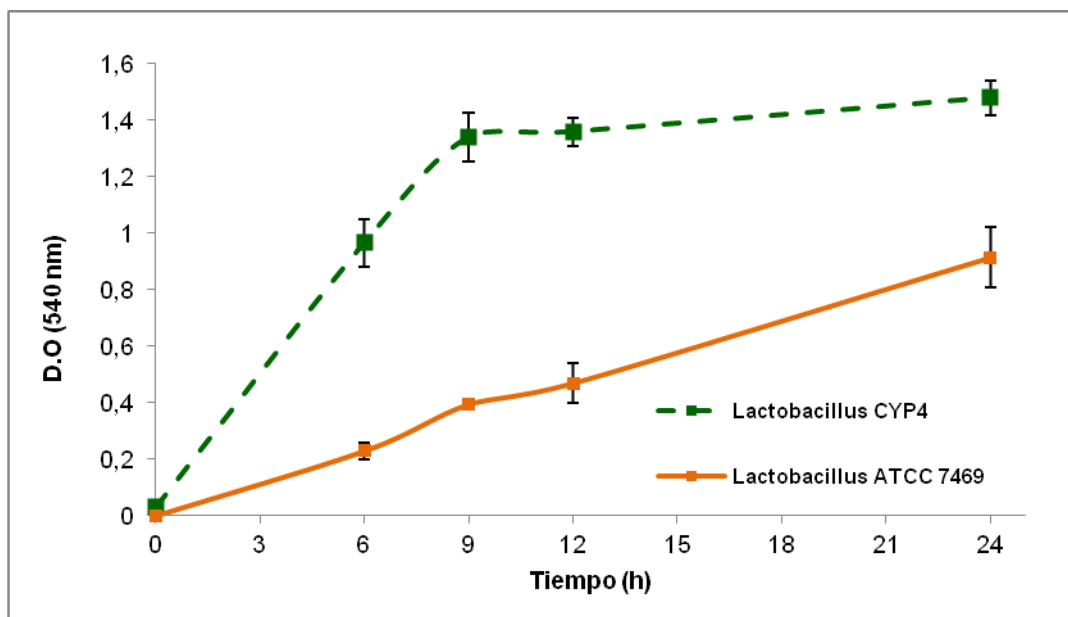
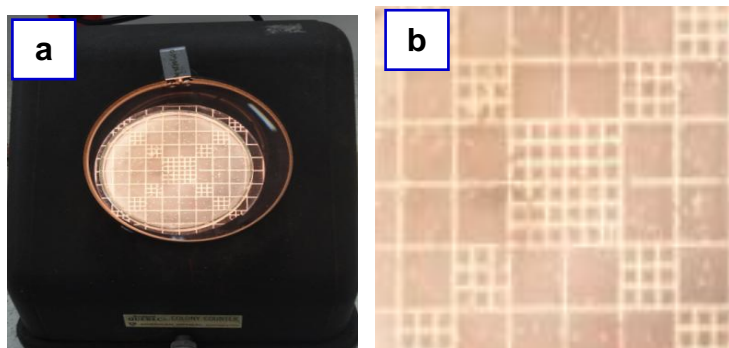


Tabla 8. Recuento de colonias de *Lactobacillus* CYP4 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 en el tiempo inicial de la fermentación

CEPA	DILUCIÓN	RESULTADOS (numero colonias)		UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC / mL)
<i>Lactobacillus</i> CYP4	10 ⁻³	+ 300	+ 300	5.7 x 10 ⁷
	10 ⁻⁴	+ 300	+ 300	
	10 ⁻⁵	48	65	
	10 ⁻⁶	11	6	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC7469	10 ⁻³	+ 300	+ 300	5.9 x 10 ⁷
	10 ⁻⁴	+ 300	+ 300	
	10 ⁻⁵	56	61	
	10 ⁻⁶	-----	-----	

Figura 28. Cámara de Neubauer (a). Ampliación de la reglilla de recuento (b).

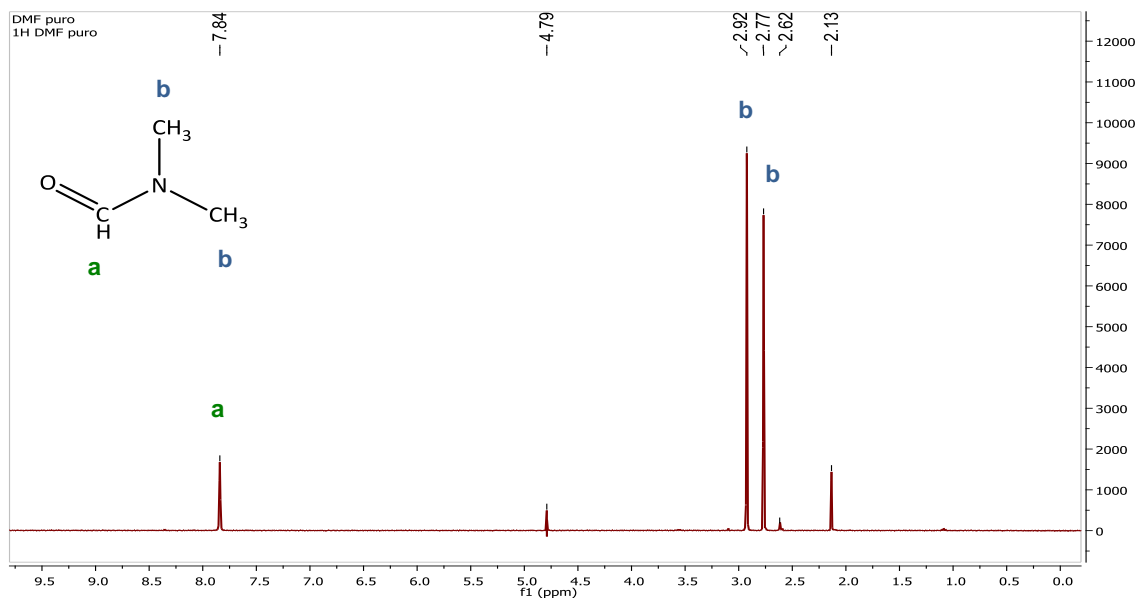


4.7.3. Cuantificación de los metabolitos de fermentación por ^1H -RMN

En la **Figura 29** se reporta el espectro de la N,N-dimetilformamida (DMF) a 7,84 ppm (1H, s, -H), aparece un singlete marcado como (a) correspondiente a un protón amídico el cual se utilizó para la cuantificación de los metabolitos. Éste protón amídico se encontró a campos bajos y no se superpuso con las señales a cuantificar de los metabolitos.

También se identificaron dos singletes a 2,77 ppm y 2,92 ppm (3H, s, $-\text{CH}_3$), marcados como (b), correspondientes a los protones metílicos de la molécula, los cuales están más protegidos electrónicamente en comparación a al protón amídico y por lo tanto aparecen a campo más altos. Teóricamente estos protones deberían tener una única señal, pero debido al efecto de rotación del carbono carboxílico existen diferencias de protección electrónica entre ellos. Las demás señales que se observan se atribuyen a impurezas. Las señales a 2,77 ppm y 2,92 ppm tampoco se superponen con las señales de los metabolitos a cuantificar.

Figura 29. Espectro ^1H -RMN (400 MHz, H₂O) de la N, N-dimetilformamida

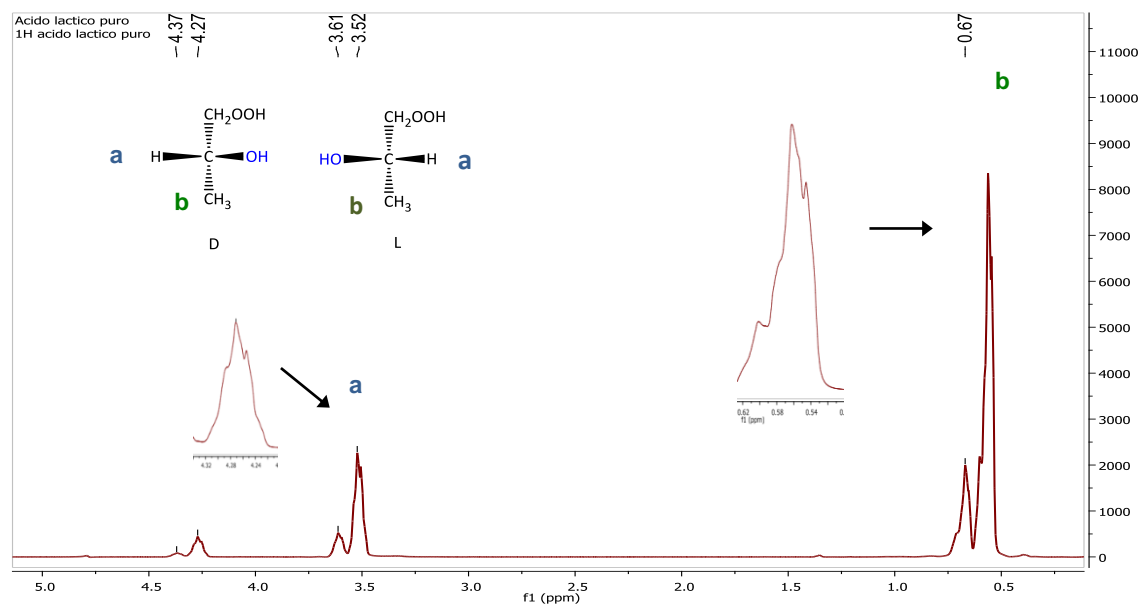


Posteriormente se realizó un análisis de ^1H -RMN a los compuestos ácido láctico, glicerol crudo, etanol y mezcla de glicerol crudo-ácido láctico, mediante el cual se determinó la señal que se podía utilizar para cuantificar estos productos en el medio de fermentación.

En la **Figura 30** se observa el espectro ^1H -RMN de ácido láctico (mezcla de formas isoméricas D y L). A altas frecuencias o campo bajos, debido al efecto electro atrayente del grupo carbonilo se identificó el protón terciario marcado como (a) en 3,52 ppm (1H, c, $J = 3,51$ Hz, -CH).

Hacia campo alto a 0,67 ppm (3H, d, $J = 0,56$ Hz, -CH₃) se encontró un doblete correspondiente a los tres protones metílicos marcados como (b). Esta señal fue utilizada para la cuantificación de ácido láctico por ser la de mayor intensidad en el espectro. Las señales a 0,67 ppm y 3,61 ppm que aparecen en el espectro corresponden a los protones de una forma isomérica del ácido láctico.

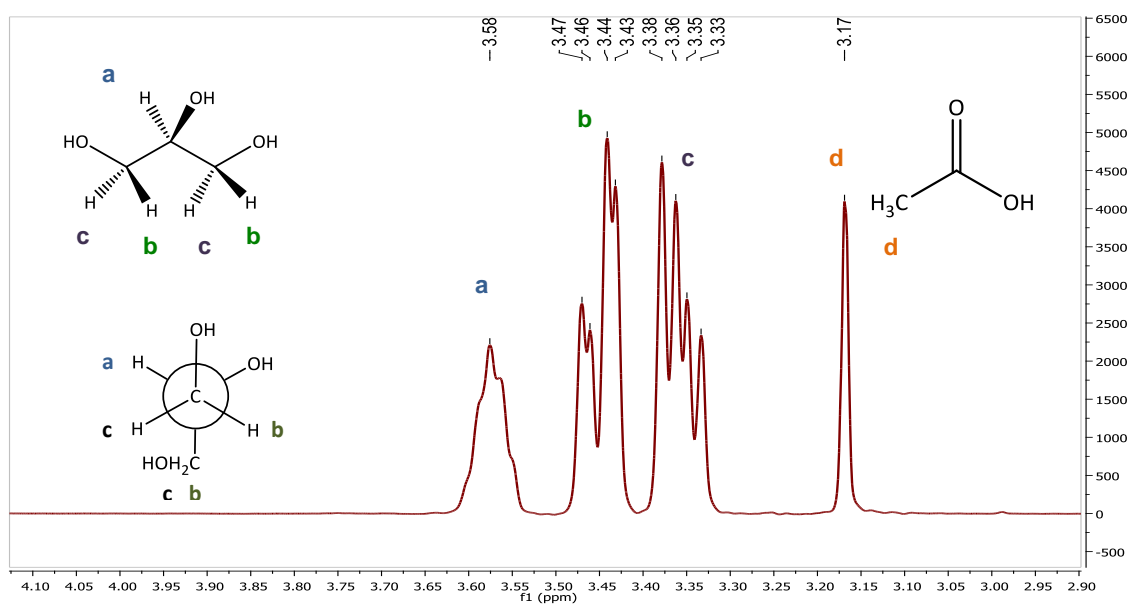
Figura 30. Espectro ^1H -RMN (400 MHz, D_2O) del ácido láctico racémico (Merck®)



La muestra de glicerol crudo como se observa en la **Figura 31**, presentó una señal a campo medio a 3,17 ppm (3H, s, $-\text{CH}_3$) la cual fue asignada a los protones metílicos del ácido acético los cuales están más apantallados electrónicamente que los protones del glicerol.

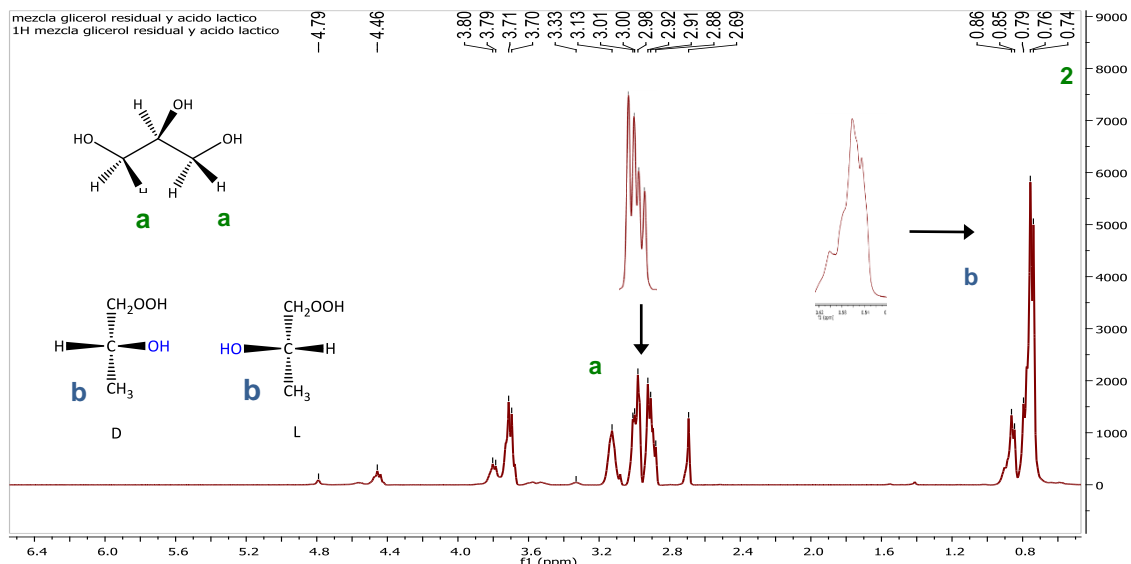
La señal que aparece a 3,58 ppm (1H, q, $-\text{CH}$) marcado como (a) corresponde al protón cuya señal teórica es un quintete en cuanto posee 4 protones vecinos, pero posiblemente debido a la alta viscosidad del glicerol crudo sus bandas se ensanchan y su forma no es muy clara. Los protones marcados como (b,c), experimentalmente aparecieron como un doblete de dobletes (2H, dd, $J=3,35$, $-\text{CH}_2$) en dos grupos separados: el primero en el rango de 3,47 ppm a 3,43 ppm y el segundo a campo más alto comprendido entre 3,38 ppm y 3,33 ppm. El grupo de señales ubicado a campo más alto fue utilizado para la cuantificación del glicerol crudo, teniendo en cuenta que ésta área correspondía a 2 protones del glicerol. Los protones de los grupos hidroxilo se intercambian con D_2O y no aparecen en el espectro. No se asignan correctamente quien es (b,c), porque solo el espectro ^1H -RMN no permiten identificarlo.

Figura 31. Espectro ^1H -RMN (400 MHz, H₂O) de glicerol crudo



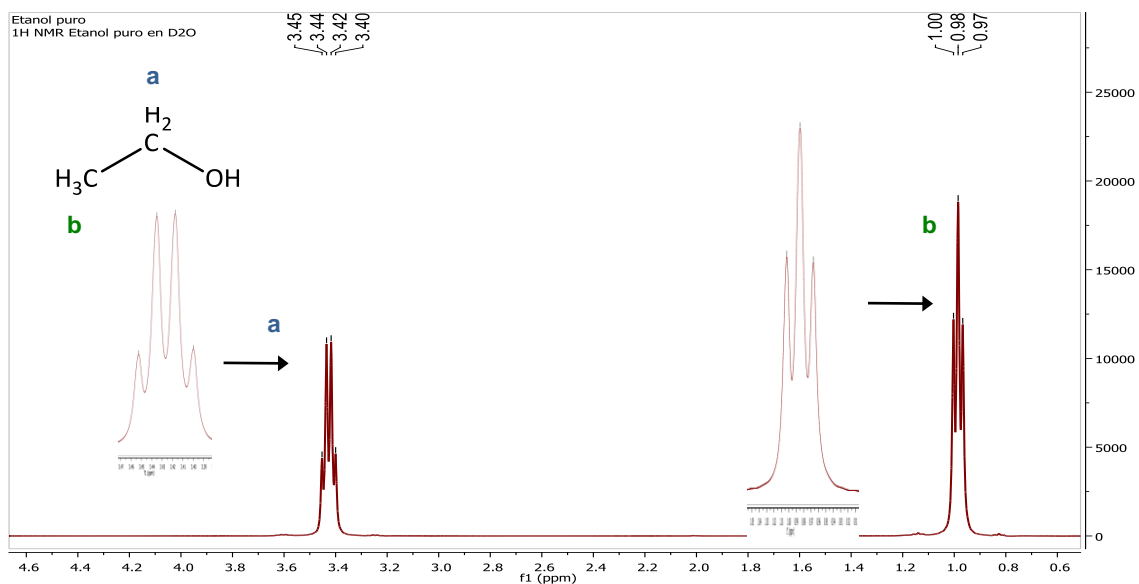
La mezcla de glicerol crudo y ácido láctico de la **Figura 32** reveló un corrimiento de los compuestos a campos más altos debido al apantallamiento que produce la nube electrónica de los componentes del medio de cultivo. Sin embargo se mantienen señales limpias para la cuantificación; la señal (a) de los protones metílicos del ácido láctico a 0,78 ppm (3H, d, $J = 0,56$ Hz, $-\text{CH}_3$) y la señal (b) correspondiente a 2 protones metilenos del glicerol crudo a 3,33 ppm y 2,69 ppm (2H, dd, $-\text{CH}_2$).

Figura 32. Espectro ^1H -RMN (400 MHz, H₂O) mezcla de glicerol crudo y ácido láctico.



Como se observa en la **Figura 33** el etanol presentó una señal de triplete a 0,98 ppm (3H, t, $J=1,0$ -CH₃), la cual correspondió a los tres protones del grupo metilo marcados como (b). Esta señal se eligió para realizar la cuantificación de etanol por ser la de mayor intensidad. A campos más bajos se encontraron los protones metilenos a 3,43 ppm (2H, c, $J=3,40$, -CH₂) marcados como (a). El protón del grupo hidroxilo no apareció debido a que presentó intercambio con deuterio.

Figura 33. Espectro ^1H -RMN (400 MHz, H₂O) de etanol.



Utilizando la señal de la N,N-dimetilformamida a 7,84 ppm correspondiente al protón amídico se integraron las áreas seleccionadas de cada compuesto las cuales se reportan en la **Tabla 9 y 11**. Los espectros de fermentación de glicerol crudo por *Lactobacillus* CYP4 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 a tiempo 0 y 24 horas se reportan en el ANEXO J.

La integración de cada área y el número de protones que la causan es directamente proporcional a la concentración molar del compuesto. Para cuantificar los metabolitos de las fermentaciones, se empleó la siguiente base de cálculo teniendo en cuenta el protón amídico del estándar interno DMF (**Ecuación 5**).

$$1 \text{ mol de DMF} \rightarrow \left(\frac{1 \text{ Unidad de Área } (\delta 7,84 \text{ ppm})}{1H} \right)$$

Ecuación 5.

Se calculó del número experimental de protones del analito responsables de la señal cuantificada (**Ecuación 6.**).

$$\text{Unidades de Área del analito} * \left(\frac{1H}{1 \text{ Unidad de Area}} \right) = \#H \text{ del analito}$$

Ecuación 6.

Con el número de protones se calculó el número de moles del analito (**Ecuación 7**).

$$\# \text{ de H del analito} * \left(\frac{1 \text{ mol}}{\# \text{ de H del analito}} \right) = \text{moles del analito}$$

Ecuación 7.

El número de moles de DMF adicionados fueron calculados teniendo en cuenta que a los sobrenadantes se les adicionó 110 μL de DMF de concentración 0,1M. **(Ecuación 8).**

$$110\mu\text{L} * \frac{0,1\text{mol}}{1\text{L}} * \frac{1\text{L}}{10^6\mu\text{L}} = 1,1 * 10^{-5} \text{ moles de DMF}$$

(Ecuación 8).

De acuerdo a la base de cálculo empleada.

$$\begin{aligned} 1 \text{ mol de DMF} &\rightarrow \# \text{ moles de analito} \\ 1,1 * 10^{-5} \text{ moles de DMF} &\rightarrow x \text{ moles de analito} \end{aligned}$$

Una vez calculadas las moles de analito y teniendo en cuenta que se analizaron 450 μL sobrenadante, se calcula la concentración del analito en mM **(Ecuación 9).**

$$x \text{ moles de analito} * \frac{1000 \text{ mmol}}{1\text{mol}} * \frac{1}{450 * 10^{-6}} = \text{Concentración del analito en mM}$$

(Ecuación 9).

Aplicando estas ecuaciones se obtuvieron las concentraciones de cada compuesto a diferentes horas de fermentación para *Lactobacillus* CYP4 **(Tabla 10)**. Para las fermentaciones de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 se realizó el mismo procedimiento **(Tabla 11)**. Las concentraciones obtenidas de a partir de las áreas de estos metabolitos se encuentran registradas en la **Tabla 12**.

Tabla 9. Áreas de glicerol y metabolitos en la fermentación anaeróbica de glicerol crudo por *Lactobacillus* CYP4

TIEMPO (h)	GLICEROL δ (ppm)			\bar{x}	ACIDO LÁCTICO δ (ppm)			\bar{x}	ETANOL δ (ppm)			\bar{x}	ÁCIDO ACÉTICO δ (ppm)			\bar{x}
0	17,85	17,59	16,41	17,28	0,84	0,96	0,71	0,84	0,13	0,25	0,22	0,20	2,58	2,94	2,41	2,64
6	16,07	16,11	14,41	15,53	2,20	2,35	1,84	2,13	2,96	2,54	2,77	2,76	2,63	2,50	2,30	2,48
9	12,61	13,75	14,64	13,67	4,14	4,30	4,62	4,35	2,46	2,37	2,82	2,55	1,97	2,13	2,28	2,13
12	11,56	11,28	10,45	11,10	4,45	4,70	4,55	4,57	1,63	2,02	2,12	1,92	2,13	1,68	1,60	1,80
24	10,84	10,01	10,64	10,50	5,98	5,63	5,41	5,67	3,29	3,35	3,28	3,31	2,23	1,77	2,04	2,01

Tabla 10. Cuantificación de glicerol y metabolitos en la fermentación anaeróbica de glicerol crudo por *Lactobacillus* CYP4

TIEMPO (h)	GLICEROL			\bar{x}	ACIDO LÁCTICO			\bar{x}	ETANOL			\bar{x}	ÁCIDO ACÉTICO			\bar{x}
	[mM]				[mM]				[mM]				[mM]			
0	218,17	214,99	200,57	211,24 ± 9,38	6,84	7,82	5,79	6,82 ± 1,02	1,06	2,04	1,79	1,63 ± 0,51	21,02	23,96	19,64	21,54 ± 2,21
6	196,41	196,90	176,12	189,81 ± 11,86	17,93	19,15	14,99	17,36 ± 2,14	24,12	20,70	22,57	22,46 ± 1,71	21,43	20,37	18,74	20,18 ± 1,35
9	154,12	168,06	178,93	167,04 ± 12,44	33,73	35,04	37,64	35,47 ± 1,99	20,04	19,31	22,98	20,78 ± 1,94	16,05	17,36	18,58	17,33 ± 1,26
12	141,29	137,87	127,72	135,63 ± 7,06	36,26	38,30	37,07	37,21 ± 1,03	13,28	16,46	17,27	15,67 ± 2,11	17,36	13,69	13,04	14,69 ± 2,33
24	132,49	122,34	130,04	128,29 ± 5,29	48,73	45,87	44,08	46,23 ± 2,34	26,81	27,30	26,73	26,94 ± 0,31	18,17	14,42	16,62	16,40 ± 1,88

*El ensayo por replicas generó altas desviaciones estándar en la cuantificación de metabolitos.

*Las desviaciones estándar del glicerol fueron mayores que las de los otros metabolitos por su carácter heterogéneo.

Tabla 11. Áreas de glicerol y metabolitos en la fermentación anaeróbica de glicerol crudo por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469

TIEMPO (h)	GLICEROL δ (ppm)			\bar{x}	ACIDO LÁCTICO δ (ppm)			\bar{x}	ÁCIDO ACÉTICO δ (ppm)			\bar{x}
0	19,26	19,16	18,07	18,83	1,91	1,92	1,79	1,87	2,51	2,52	2,34	2,46
6	17,11	17,51	17,76	17,46	3,48	3,44	3,26	3,39	2,08	2,18	2,23	2,16
9	17,26	17,39	17,11	17,25	2,90	2,95	2,90	2,92	2,61	2,64	2,60	2,62
12	16,53	16,25	17,21	16,66	3,26	3,22	3,73	3,40	2,98	2,99	3,16	3,04
24	15,14	15,78	15,76	15,56	3,06	3,14	3,14	3,11	2,40	2,44	2,47	2,44

Tabla 12. Concentración de glicerol y metabolitos en la fermentación anaeróbica de glicerol crudo por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469

TIEMPO (h)	GLICEROL [mM]			\bar{x}	ACIDO LÁCTICO [mM]			\bar{x}	ÁCIDO ACÉTICO [mM]			\bar{x}
0	235,40	234,18	220,86	230,14 \pm 8,07	15,56	15,64	14,59	15,26 \pm 0,59	20,45	20,53	19,07	20,02 \pm 0,82
6	209,12	214,01	217,07	213,40 \pm 4,01	28,36	28,03	26,56	27,65 \pm 0,95	16,95	17,76	18,17	17,63 \pm 0,62
9	210,96	212,54	209,12	210,87 \pm 1,71	23,63	24,04	23,63	23,77 \pm 0,24	21,27	21,51	21,19	21,32 \pm 0,17
12	202,03	198,61	210,34	203,66 \pm 6,03	26,56	26,24	30,39	27,73 \pm 2,31	24,28	24,36	25,75	24,80 \pm 0,82
24	185,04	192,87	192,62	190,18 \pm 4,45	24,93	25,59	25,59	25,37 \pm 0,38	19,56	19,88	20,13	19,85 \pm 0,29

*Un ensayo por triplicado sin replicas generó desviaciones estándar menores

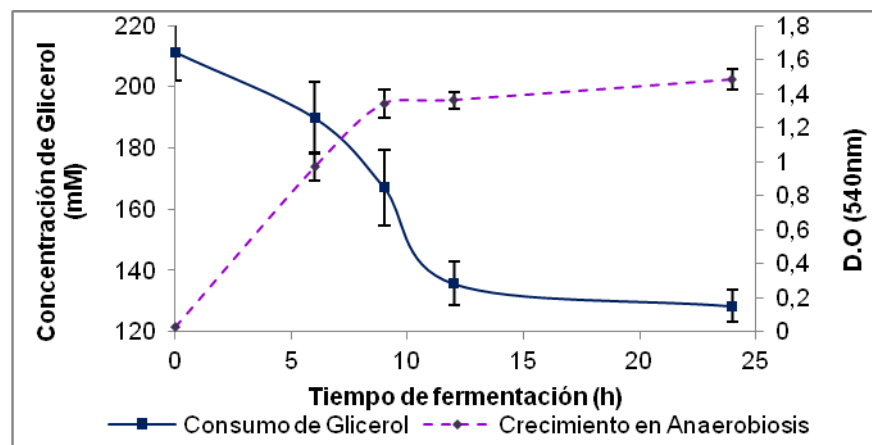
*Las desviaciones estándar del glicerol fueron mayores que las de los otros metabolitos por su carácter heterogéneo.

4.7.4. Análisis de metabolitos de fermentación de glicerol crudo

4.7.5. Fermentación anaeróbica por *Lactobacillus* CYP4

De acuerdo con la curva de crecimiento de *Lactobacillus* CYP4 en anaerobiosis (**Figura 34**) se observa que el microorganismo inicia su etapa exponencial de crecimiento a las 3 horas de fermentación y culmina a las 9 horas, lo cual coincide con el perfil de consumo de glicerol. Después de 12 horas de fermentación comienza la fase estacionaria en la cual el microorganismo no asimila más glicerol para su crecimiento.

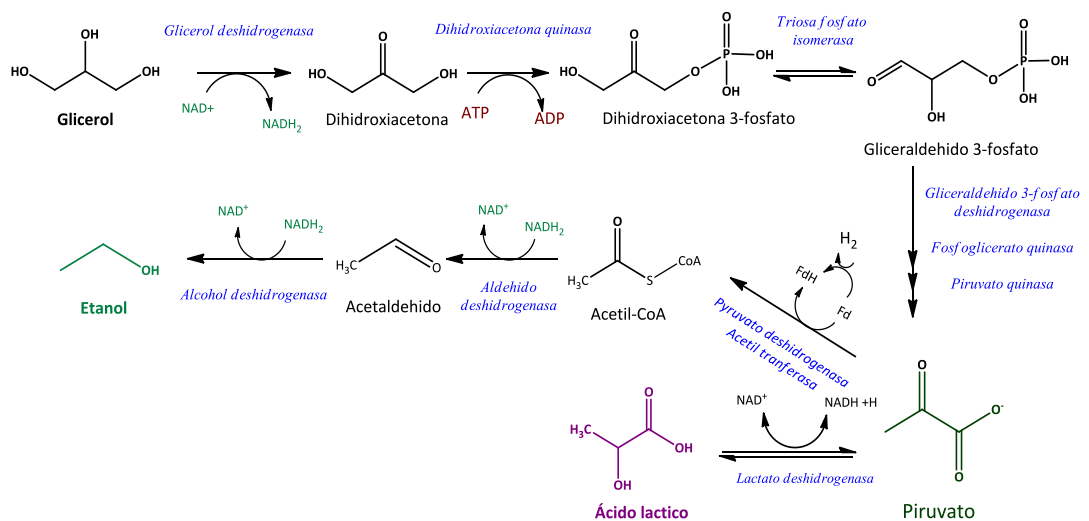
Figura 34. Curva de crecimiento y consumo anaeróbico de glicerol crudo por *Lactobacillus* CYP4



De acuerdo con la ruta metabólica propuesta por Pasteris, 2009 (**Figura 35**), el glicerol fue metabolizado por las enzimas glicerol deshidrogenasa (EC 1.1.1.6) la cual oxida el glicerol a dihidroxiacetona por reducción de NAD^+ a NADH_2 . La enzima dihidroxiacetona quinasa (EC 2.7.1.29), fosforila a dihidroxiacetona 3-fosfato, posteriormente por la enzima triosa fosfato isomerasa (EC 5.3.1.1) oxida a gliceraldehido 3-fosfato el cual vía glucólisis se transforma en piruvato el cual es finalmente reducido para obtener lactato a través de la enzima lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27). (Garai, 2010). El glicerol en el metabolismo de *Lactobacillus* CYP4 no sigue la ruta glicerol quinasa (Ec 2.7.1.30) puesto que en

condiciones anaeróbicas debido a la ausencia de oxígeno no participa una cadena transportadora de electrones y el aceptor de los mismos es una molécula transportadora como el NAD (Yazdani 2007). *Lactobacillus* CYP4 al ser un microorganismo heterofermentativo (Frioni, 1999) posee las enzimas piruvato deshidrogenasa (EC 1.2.4.1) y acetil transferasa (EC 2.3.1.12) que por descarboxilación oxidativa del piruvato forman la acetil-CoA. Por medio de la enzima acetaldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.3) se transforma a acetaldehído y finalmente se obtuvo etanol por medio de la enzima alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) (Pasteris, 2009).

Figura 35. Ruta metabólica anaeróbica de fermentación de glicerol crudo por *Lactobacillus* CYP4



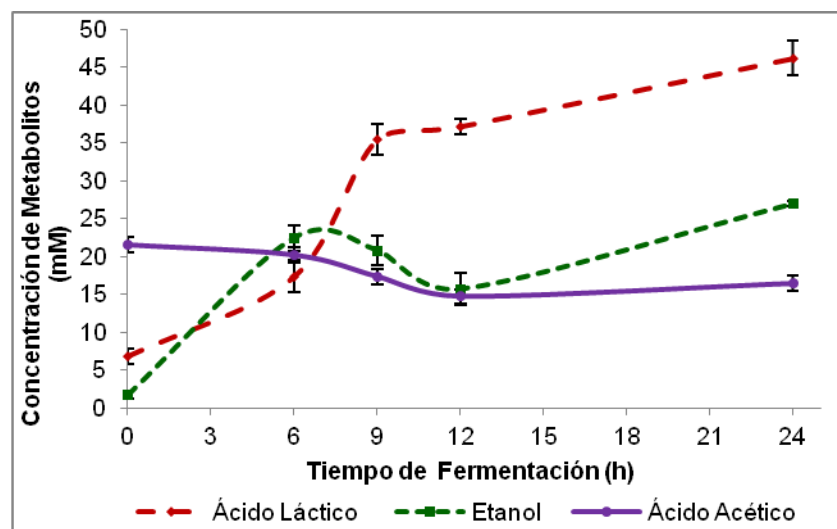
Fuente: Pasteris, 2009

Por deducción se sugiere que el microorganismo no posee las enzimas glicerol deshidratasa (EC 4.2.1.30) y 1,3-propanodiol deshidrogenasa (EC 4.2.1.28) (Pasteris 2009; Garai, 2010) ya que en los sobrenadantes no fueron detectados mediante (^1H -RMN, y HPLC) 1,3-propanodiol, ácido 3-hidroxipropanoico ni acrilaldehído o acroleína. De acuerdo con (**Figura 36**) se puede observar una cantidad de 6,82 mM de ácido láctico y 1,83 mM etanol en el tiempo inicial. Esto

se debe a que el preinoculo que se tomó para la fermentación además del bacterias ($5,7 \times 10^7$ UFC / mL) contenía los metabolitos ácido láctico y etanol. El ácido láctico aumentó durante la fermentación obteniéndose un valor máximo de 46,23 Mm a las 24 horas. La concentración de etanol aumentó en las primeras 6 horas, permaneció constante a las 9 horas, disminuyó a las 12 horas y a las 24 horas se obtuvo su máxima concentración de (26,94 mM). Como se pudo observar la muestra contenía inicialmente ácido acético como contaminante, pero su valor permanece prácticamente constante en el tiempo por lo cual no se considera ni sustrato ni producto de la fermentación.

Se observó que a las 6 horas la concentración de etanol fue mayor que la de ácido láctico. Sin embargo, entre las 6 y las 12 horas la producción de ácido láctico fue mayor lo cual implica mayor actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27). No obstante, entre las 12 y 24 horas la concentración del ácido en el medio provocó una disminución en el pH que disminuyó la producción (Valdez 1997), por lo tanto, el glicerol dentro del metabolismo siguió la ruta piruvato deshidrogenasa (EC 1.2.4.1) y aumentó la producción de etanol.

Figura 36. Metabolitos de fermentación anaeróbica de glicerol crudo por *Lactobacillus* CYP4

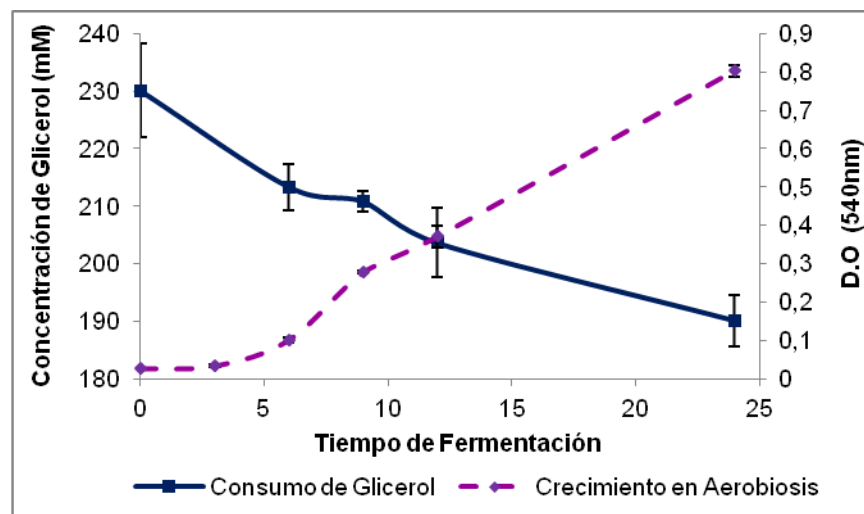


Cabe resaltar que el ácido láctico cuantificado corresponde a una mezcla de D y L ácido láctico. Claisse, 2000 y Pasteris, 2009 reportaron la cuantificación empleando el kit enzimático de Boehringer-Manheim, Inc (Germany). Las barras de desviación estándar en la cuantificación de metabolitos representa el grado de reproducibilidad de la medida tomada. Se puede deducir que la producción de ácido láctico es directamente proporcional al crecimiento del microorganismo, bajo las condiciones evaluadas, este metabolito está relacionado directamente con el crecimiento celular ya que se produjo principalmente en la fase exponencial, pero también, aunque en menor proporción, en la fase estacionaria. Se observa un comportamiento similar para el etanol.

4.7.6. Fermentación aeróbica por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469

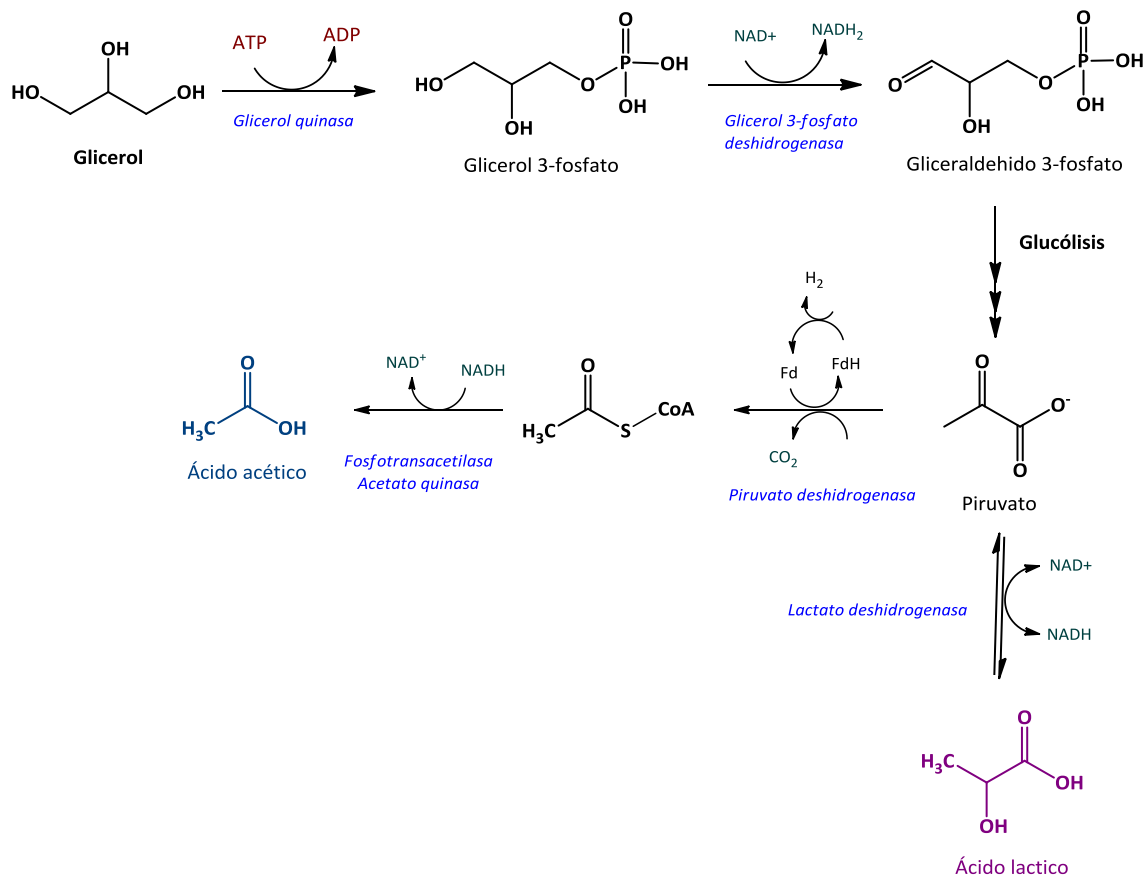
De acuerdo con la curva de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 en aerobiosis (**Figura 37**) se observó que el microorganismo inició su etapa exponencial de crecimiento a las 3 horas y se extendió hasta las 24 horas, sin alcanzar su fase estacionaria, lo cual coincide con el hecho de que el consumo de glicerol no se haya estabilizado en la fermentación

Figura 37. Curva de crecimiento y consumo aeróbico de glicerol crudo por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469



En condiciones aeróbicas, de acuerdo con la ruta metabólica propuesta por (Álvarez, 2004; Garai, 2008) (**Figura 38**), el glicerol entra a la célula para facilitar su difusión y luego es convertido a glicerol 3-fosfato por la enzima glicerol quinasa (EC 2.7.1.30) que usa el ATP como donador de grupos fosforilo. Esto se puede concluir por el estudio genético realizado por Álvarez 2004 quien reportó la presencia de dos genes de glicerol quinasa (EC 2.7.1.30) (*gykA* y *glpK*) y la no detección de la enzima glicerol deshidrogenasa (EC 1.1.1.6). Glicerol 3-fosfato es transformado a piruvato por medio de la glucólisis y finalmente por la enzima lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27) a ácido láctico.

Figura 38. Ruta metabólica de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469



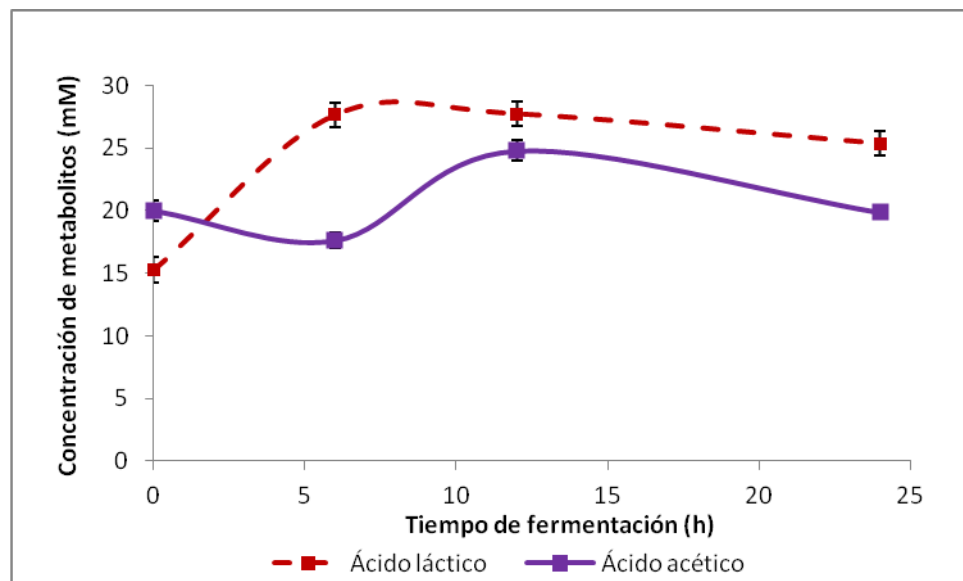
Fuente: Álvarez, 2004

Como productos de fermentación se obtuvieron ácido láctico, bajas cantidades de ácido acético y dióxido de carbono (no cuantificado en la fermentación), no se detectaron mediante RMN acetoina ni 2,3 butanodiol reportados por Álvarez 2004. Tampoco se obtuvieron en la fermentación etanol, 3-hidroxiopropanaldehído ni 1,3-propanodiol ni acroleína (Álvarez, 2004).

De acuerdo con la **Figura 39** se puede observar una cantidad de 15,26 mM de ácido láctico en el tiempo inicial, esto se debe a que la fermentación inició con un preinóculo de bacterias de $5,7 \times 10^7$ UFC/mL. El ácido láctico aumentó durante la fermentación obteniéndose un valor máximo de 27,73 mM a las 12 horas.

Se observa un incremento de la producción de ácido acético entre las 6 y las 12 horas, este resultado sugiere que más piruvato estuvo disponible para llevar a ATP a través de piruvato deshidrogenasa (EC 1.2.4.1) y acetato quinasa (2.7.2.1).

Figura 39. Metabolitos de fermentación aeróbica de glicerol crudo por *Lactobacillus* ATCC 7469



4.8. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE BIOCONVERSIÓN DE GLICEROL

Los datos calculados de porcentaje de rendimiento, porcentaje de conversión y productividad volumétrica (**Tabla 13**) se calcularon con base en los resultados de concentración de glicerol y ácido láctico medidos a diferentes tiempos de fermentación.

Tabla 13. Parámetros productivos de glicerol crudo a ácido láctico de las cepas evaluadas.

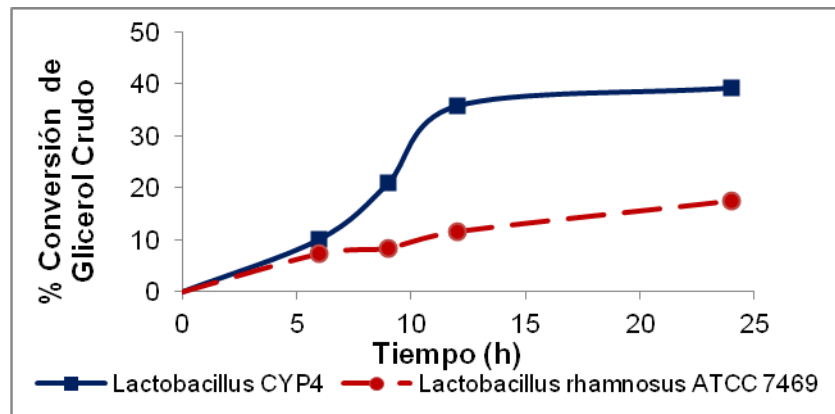
TIEMPO (h)	<i>Lactobacillus</i> CYP4				<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469			
	% CG	Y'_{ps} (g/g)	g (AL)	$Q \left(\frac{g}{L.h} \right)$	% CG	Y'_{ps} (g/g)	g (AL)	$Q \left(\frac{g}{L.h} \right)$
6	10,14	0,52	1,06	0,71	7,27	0,80	1,24	0,83
9	20,93	0,71	2,88	1,28	8,37	0,48	0,85	0,38
12	35,80	0,44	3,05	1,02	11,50	0,51	1,25	0,42
24	39,27	0,51	3,96	0,66	17,36	0,27	1,02	0,17

4.8.1. Evaluación del porcentaje de conversión de glicerol

Como se observa en la **Figura 40**, se obtuvo un mayor porcentaje de conversión de glicerol crudo (% CG) por parte de *Lactobacillus* CYP4 en todos los tiempos medidos, alcanzando la máxima conversión a las 24 horas con un valor de 39,27%, en comparación a *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 el cual fue 17,56% a ese mismo tiempo. Se puede atribuir esta mayor conversión de *Lactobacillus* CYP4 a la producción de dos sustratos (ácido láctico y etanol), mientras que *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 produjo ácido láctico y pequeñas cantidades de ácido acético. Se observó además que la conversión del glicerol por *Lactobacillus* CYP4 en el intervalo de las 6 a 12 horas aumentó considerablemente, teniendo en cuenta que en esta etapa también se logra el crecimiento exponencial del microorganismo y se entiende que la conversión se

utilizó no solo para la producción de metabolitos sino también para el mantenimiento celular.

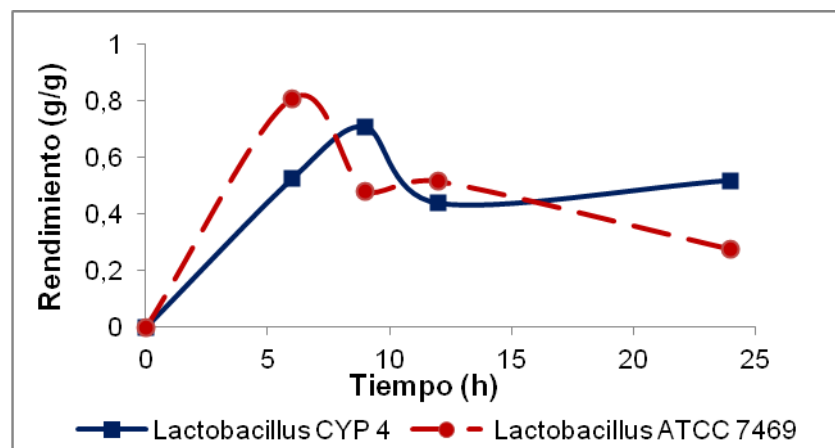
Figura 40. Comparación porcentaje de conversión de glicerol crudo entre *Lactobacillus* CYP4 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469



4.8.2. Evaluación del rendimiento de la reacción (g/g)

En cuanto al rendimiento de ácido láctico (Y'_{ps}), como se observa en la **Figura 41**, fue más alto para *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 a las 9 horas debido a que solo utilizó el glicerol como sustrato para producir ácido láctico, mientras que *Lactobacillus* CYP4 lo utilizó para producir ácido láctico y etanol.

Figura 41. Comparación del rendimiento de ácido láctico entre *Lactobacillus* CYP4 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.



Al comparar estos valores con los reportados en la literatura para otros sustratos como se observa en la **Tabla 14**, se puede decir que el glicerol es una fuente de carbono promisorio para producir ácido láctico utilizando las dos cepas estudiadas en este proyecto.

Tabla 14. Comparación del rendimiento de ácido láctico utilizando otras fuentes de carbono y otros microorganismos.

SUSTRATO	MICROORGANISMO UTILIZADO	Y'_{ps} (g/g)
Almidón de trigo	<i>Lactobacillus lactis</i> ATCC 19435	0,77
Almidón de cebada	<i>Lactobacillus casei</i> NRRL-441	0,87
Almidón de patatas	<i>Rhizopus oryzae</i>	0,87
Celulosa de madera	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> NRRL B-548	0,80
Glicerol crudo	<i>Lactobacillus</i> CYP4	0,70*
Glicerol crudo	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	0,80*

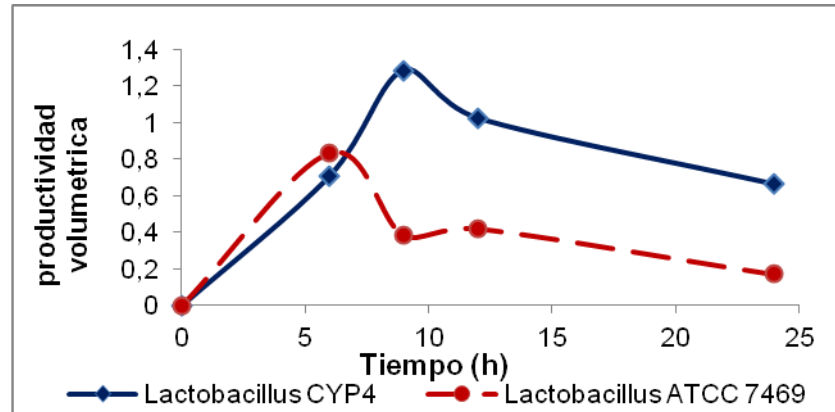
* Analizados en este proyecto.

Fuente: Rojan, 2009.

4.8.3. Evaluación de la productividad volumétrica de ácido láctico (g/L.h)

La mayor productividad volumétrica $Q \left(\frac{g}{L.h} \right)$, con un valor de 1,28 g/L.h (**Figura 42**) fue obtenida por *Lactobacillus* CYP4 a las 9 horas la cual fue superior a la máxima productividad que obtuvo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 a las 6 horas con un valor de 0,83. El valor de este parámetro cinético nos permitió evaluar que *Lactobacillus* CYP4 es una cepa nativa que podría producir desde un punto de vista industrial metabolitos como ácido láctico y etanol a partir de glicerol crudo proveniente de la industria del biodiesel.

Figura 42. Comparación de productividad volumétrica de ácido láctico entre *Lactobacillus* CYP4 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.



Las productividades volumétricas obtenidas por los dos microorganismos se pueden comparar con los reportados por otros autores usando diferentes fuentes de carbono al glicerol como se observa en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Comparación de la productividad volumétrica de ácido láctico utilizando otras fuentes de carbono y otros microorganismos.

SUSTRATO	MICROORGANISMO UTILIZADO	PRODUCTIVIDAD $Q \left(\frac{g}{L \cdot h} \right)$
Trigo	<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 19435	1,0
Madera	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> NRRL 395	0,7
Centeno	<i>Lactococcus paracasei</i> N8	2,4
Arroz	<i>Lactococcus</i> sp. RKY2	2,9
Dulce de sorgo	<i>Lactobacillus paracasei</i> N8	2,7
Glicerol crudo	<i>Lactobacillus</i> CYP4	1,28*
Glicerol crudo	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	0,70*

* Analizados en este proyecto.

Fuente: Wee, 2006

CONCLUSIONES

Dieciséis de las treinta y siete cepas aisladas fueron capaces de crecer y metabolizar glicerol USP.

La cepa de *Lactobacillus* CYP4, seleccionada por la mayor producción de ácido láctico, fue identificada por pruebas bioquímicas (fermentación de 12 carbohidratos y 3 alcoholes)

Lactobacillus CYP4 presentó una adaptación considerable en agar MRS modificado con glicerol crudo. Su biomasa pasó de una densidad óptica de 0,21 a las 24 horas a 1,48 a este mismo tiempo.

La mayor producción de ácido láctico por la cepa nativa de *Lactobacillus* CYP4 se obtuvo en condiciones de anaerobiosis de acuerdo con los resultados obtenidos por HPLC.

Bajo las mejores condiciones de cada cepa bacteriana, *Lactobacillus* CYP4 produjo mayor cantidad de ácido láctico 39,41 mM en comparación con *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 que produjo 10,11 mM.

El mayor rendimiento del proceso (71%) por *Lactobacillus* CYP4 se obtuvo con una concentración de 178,98 mM de glicerol como fuente de carbono, a las 9 horas de fermentación.

Lactobacillus CYP4 logró degradar el glicerol crudo por la ruta metabólica glicerol deshidrogenasa o glicerol quinasa, por ésta razón, no se observó la producción de 1,3 propanodiol correspondiente a la ruta glicerol deshidratasa. Además, fue capaz de producir etanol, un compuesto de alto interés industrial debido a su perfil energético potencialmente sostenible por sus ventajas económicas y medioambientales.

Se estandarizó el método de cuantificación de ácido láctico, ácido acético glicerol y etanol por medio de la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de protones ($^1\text{H-RMN}$), a través de la selección de N,N-dimetilformamida como sustancia patrón de cuantificación.

La cepa nativa aislada es una alternativa en la industrial del biodiesel para desarrollar metabolitos de innovación en áreas de la biotecnología.

RECOMENDACIONES

Analizar la producción de ácido láctico por *Lactobacillus* CYP4 en un medio de crecimiento más económico.

Realizar un escalado del proceso de producción de ácido láctico a partir del glicerol crudo y evaluar la rentabilidad para la producción comercial.

Aprovechar el cepario de *Lactobacillus* nativos realizado a lo largo de este proyecto para encontrar soluciones biotecnológicas a otros desechos industriales.

Este estudio se centró en los productos extracelulares de las dos cepas, se recomienda analizar los posibles productos intracelulares

Identificar los productos intermedios de fermentación para corroborar las rutas metabólicas de asimilación de glicerol crudo propuestas para *Lactobacillus* CYP4 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

DIVULGACIÓN

Los resultados de este proyecto han sido aceptados y se presentarán en modalidad de ponencia bajo el título: "PRODUCTION OF LACTIC ACID FROM BIODIESEL RAW GLYCEROL BY *Lactobacillus spp.* native strain" en la VII conferencia de la UNESCO sobre desarrollo sostenible en energía, agua y sistemas ambientales, que se llevará a cabo del 1-6 de julio de 2012 en Ohrid, República de Macedonia.

BIBLIOGRAFÍA

ALVAREZ F.; Medina R.; Pasteris S.; Saad A.; Sesna F. Glycerol metabolism of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469: cloning and expression of two glycerol kinase genes. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2004. (7): 170–18.

BAUTISTA G. Determinación de los parámetros de mayor influencia en la producción de ácido láctico por fermentación discontinua a partir de melaza. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias. Escuela de Química. 1990.

BENAVIDES G.; Hermida A. Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los páramos cruz verde y guasca (Cundinamarca). Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Escuela de Microbiología Industrial. 2008.

BERKELEY R.; Claus D. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore. 1986.

BOGAERT J.; Naidu A. Lactic acid natural food antimicrobial systems. CRC Press. New York. 2000. Cap 22.

CANCINO J.; Gómez J. Caracterización de los productos obtenidos a partir de la fermentación de glicerol crudo con microorganismos nativos. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. 2011. p. 153.

CLAISSE O.; Lonvaud-Funel A. Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. *Food Microbiology.* 2000. (17): 513-519.

CLARK S.; Barnett A.; Adams M.; Cook I.; Dyson G.; Johnston G. Monitoring a commercial fermentation with Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy with the aid of chemometrics. *Analytica Chimica Acta*. 2006. (563): 338-345.

CULTIMED. Manual de básico de microbiología. Medios de cultivo MRS. Panreac. 2003. pp.64-67.

DA SILVA G.; Mack M.; Contiero J. Research review paper. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advance*. 2009. (27): 30–39.

DUQUE A. Design and analysis of technological schemes for glycerol conversion to added value products. Manizales. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Departamento de Ingeniería Eléctrica, Electrónica y Computación. 2011. pp.129-131.

ERTOLA R.; Yantorno O. Microbiología Industrial: medio de fermentación. BiologíaUnalM. Citado el 20/12/11. Disponible en línea: <http://www.biologia.edu.ar/microind/aspectos%20generales.htm>

Federación nacional de biocombustibles de Colombia “plantas productoras de biodiesel”. Fedecombustibles. Citado el 28/01/12. Disponible en línea: <http://www.fedebiocombustibles.com/v2/nota-web-id-271.htm>

FRIONI L. Procesos microbianos. Editorial de la Fundación Universidad Nacional del Río Cuarto. Argentina. 1999. Capítulo 6. p.3.

GARAI G. Bacterias lácticas de sidra natural implicación de alteraciones y potencial probiótico de cepas productoras de (1,3) (1,2)- β -D-glucanos. San

Sebastián- España. Universidad del País Vasco. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química Aplicada. 2010. pp. 45-47.

GARAI G.; Ibarburu I.; Berregi I.; Claisse O.; Lonvaud A.; Irastorza A.; Dueñaz M. Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. *Int J Food Microbiol.* 2008. (121): 253–261

GADEN E. Fermentation process kinetics. *J.Biochem Microbiol Tech Eng.* 1959. (1): 413-429.

GREASHAM R. Media for microbial fermentations. *Biotechnology.* 1993. (7):128-137.

JERNIGAN R.; Hansrote S.; Ramey K; Richardson L.; Seay J. Developing sustainable chemical processes to utilize waste crude glycerol from biodiesel production. The biodiesel handbook. CRC Press. New York. 2010. Cap 31.

JOHNSON T.; Taconi, K.The Glycerin Glut: Options for the Value-Added Conversion of Crude Glycerol Resulting from Biodiesel Production. *Environmental Progress.* 2007 (26): 338-348.

LEE J.; Hong Y.;Lee C. Characterization of fermentative behaviors of lactic acid bacteria in grape wines through ¹H NMR- and GC-Based metabolic profiling. *J.Agric. Food Chem.* 2009. (57): 4810-4817.

LÓPEZ E.; Cabredo S.; Lopez M.; Avenoza A.; Busto J.; Peregrina J. A thorough study on the use of quantitative ¹H-NMR in rioja red wine fermentation processes. *J. Agric. Food Chem.* 2009. (57): 2112-2118.

LÜTHI-PENG Q.; Dileme F.; Puhan Z. Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 2002. (59): 289–296.

MACFADDIN J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera edición. Editorial médica panamericana. 2004. pp. 54-59, 74-78 y 497-498

MAZUMDAR S.; Clomburg J.; Gonzalez R. *Escherichia coli* strains engineered for homofermentative production of d-lactic acid from glycerol. *Appl. Environ Microbiol.* 2010. (76): 4327–4336.

MERCK CHEMICALS. Test de ácido láctico. Citado el 2/1/2012. Disponible en línea: www.merck-chemicals.com/colombia/test-acido-lactico/

OROZCO M.; Solarte J. Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa. Manizales. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Escuela de Ingeniería Química. 2003. pp.18-19

PASTERIS S.; Saad S. Sugar-Glycerol cofermentations by *lactobacillus hilgardii* isolated from wine. *J. Agric. Food Chem.* 2009. (57): 3853–3858.

PRIETO D.; Rojas L. Evaluación de la influencia de las variables fisicoquímicas en el proceso de fermentación de glicerol crudo utilizando un microorganismo nativo. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander, Escuela de Ingeniería Química. 2011. p. 27.

RATANAPARIYANUCH K.; Shen J.; Jia Y.; Tyler R.; Young M. Rapid NMR method for the quantification of organic compounds in thin stillage. *J. Agric. Food Chem.* 2011. (59): 10454-10460.

ROJAN J.; Anisha G.; Nampoothiri K.; Pandey A. Review: Direct lactic acid fermentation: focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. *Biotechnology Advances*. 2009. (27): 145–152.

SCOTT F. Elementos de ingeniería de las reacciones químicas. S.I.:Pearson educacion. 2008. p.247.

SERNA L.; Naranjo E. Producción de ácido láctico por una mezcla de *lactococcus lactis* y *streptococcus salivarius* en fermentaciones en discontinuo. Revista Colombiana de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. DC. 2005. (7): 32-38.

SERNA L.; Rodríguez S.; Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 2005. (5): 54-65.

SIGMA ALDRICH. Citado el 30/02/2012. Disponible en línea: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Application_Notes/4568.Par.0001.File.tmp/4568.pdf

TALARICO Todd.; Axelsson L.; Novotny J.; Fiuzat M.; Dobrogosz W. Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol:NAD⁺ Oxidoreductase. *Appl. Environ Microbiol*. 1990. (56): 943-948.

TEUSINK B.; Wiersma A.; Jacobs L.; Notebaart R.; Simid E. Undersanding the adaptative growth strategy of *Lactobacillus plantarum* by silico optimisation. *PLos Computational Biology*. 2009. (5): 1-8.

TORTORA Gerard.; Funke B.; Case C. Introducción a la microbiología. Novena edición. Editorial Médica Panamericana. 2007. pp. 176-183.

VALDEZ G F.; Ragout A.; Bruno-Bárcena J.; Diekman H and Siñeriz F. Shifts in pH affect the maltose/glycerol co-fermentation by *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnology letters*. 1997. (19): 645-649.

VEIGA M.; Foster M. Sugar-Glycerol cofermentations in Lactobacilli: the fate of lactate. *Journal of bacteriology*. 1992. (174): 1013-1019.

WEE Y. *et al.* Review: Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol. Biotechnol.* 2006 (44): 163–172.

WINN Washington.; Allen S.; Janda W.; Koneman E.; Procop G.; Schreckenberger P.; Woods G. Koneman diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana. 2008. pp. 730,799, y 837-840.

YAZDANI S.; Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr Opin Biotechnol.* 2007. (18): 213–219.

ZAPATA C.; Martínez I.; Arenas E.; Henao C. Producción de biodiesel a partir de aceite crudo de palma: 1. Diseño y simulación de dos procesos continuos. Medellín. Universidad Nacional de Colombia. Revista Dyna. 2007. p.72

ANEXOS

Anexo A. Nomenclatura de las enzimas implicadas en las rutas bioquímicas

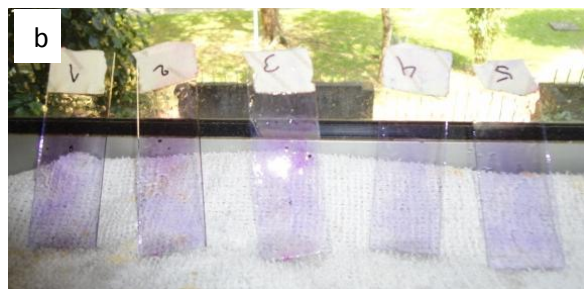
IUPAC	NOMBRE
EC 1.1.1.1	Alcohol Deshidrogenasa
EC 1.1.1.27	Lactato Deshidrogenasa
EC 1.1.1.35	3-Hidroxiacil-Coa Deshidrogenasa
EC 1.1.1.35	3-Hidroxiacil-Coa Dehidrogenasa
EC 1.1.1.6	Glicerol Deshidrogenasa
EC 1.2.1.12	Gliceraldehido 3-Fosfato Deshidrogenasa
EC 1.2.1.57	Butanol Deshidrogenasa
EC 1.3.99.	Succinato Deshidrogenasa
EC 2.1.3.1	Metilmalonil-Coa Carboxitransferasa
EC 2.2.1.6	Acetolactato Sintasa
EC 2.3.1.19	Fosfato Butiriltransferasa
EC 2.3.1.19	Fosfate Butiriltransferasa
EC 2.3.3.1	Citrato (Si)-Sintasa
EC 2.7.1.29	Dihidroxiacetona Quinasa
EC 2.7.1.30	Glicerol Quinasa
EC 2.7.1.40	Piruvato Quinasa
EC 2.7.2.3	Fosfoglicerato Quinasa
EC 2.7.2.7	Butirato Quinasa
EC 3.1.3.77	Enolasa
EC 4.1.1.5	Acetolactato Descarboxilasa
EC 4.2.1.11	Piruvato Quinasa
EC 4.2.1.2	Fumarato Fidratasa
EC 4.2.1.30	Glicerol Deshidratasa
EC.1.6.99.3	Diaforasa NADH Deshidrogenasa
EC. 1.11.1.6	Catalasa

Anexo B. Protocolo prueba de tinción de Gram

La prueba de tinción de Gram se llevó a cabo de acuerdo al siguiente procedimiento.

- Recoger muestras.
- Hacer el extendido en espiral y dejar secar a temperatura ambiente.
- Fijar la muestra durante un minuto o al calor (flameado 3 veces aprox.)
- Agregar azul violeta (cristal violeta o violeta de genciana) y esperar 1 minuto.
- Enjuagar con agua.
- Agregar lugol y esperar 1 minuto y enjuagar con agua.
- Agregar acetona y/o alcohol y lavar de inmediato con agua.
- Tinción de contraste agregando safranina o fucsina básica y esperar 30 seg. Este tinte dejará de color rosado-rojizo las bacterias Gram negativas.
- Enjuagar con agua.
- Para observar al microscopio óptico es conveniente hacerlo a 100x con aceite de inmersión.

Figura1. Reactivo para la tinción de Gram (a). Laminas coloreadas (b).



Anexo C. Protocolo prueba de catalasa

La prueba de catalasa se llevó a cabo de acuerdo al siguiente procedimiento.

- Con un palillo de madera recoger el centro de una colonia pura de 18-24 horas y colocar sobre un portaobjetos limpio de vidrio.
- Agregar con gotero o pipeta Pasteur una gota de H_2O_2 al 30% sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo.
- Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo). Si no presenta formación de burbujas el resultado es negativo.
- Desechar el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.
- Si se invierte el orden del método (extender la colonia sobre el agua oxigenada) pueden producirse falsos positivos.

Figura 2. Resultado negativo de la prueba de catalasa.



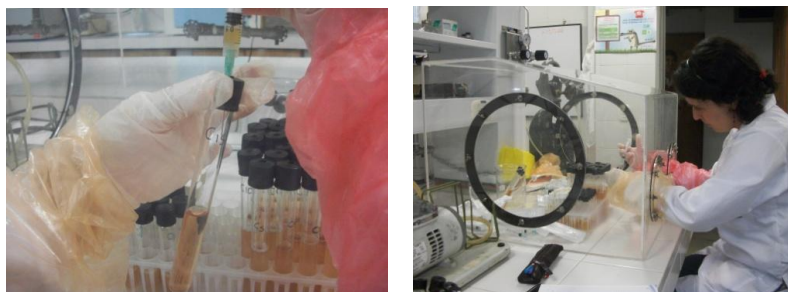
Anexo D. Protocolo de criopreservación

Preparación del inóculo.

Este procedimiento se realizó en el laboratorio de biotecnología del edificio de ingeniería química puesto que allí se encuentra una cabina de anaerobiosis.

- Luego de autoclavar los tubos de ensayo con tapón de caucho y 10 mL de caldo MRS modificado (sin acetato de sodio y Tween 80) se introdujeron en la cabina de anaerobiosis junto con 37 jeringas de 3 mL y el cepario, se cerró herméticamente la cabina.
- Se creó un ambiente microerobio con una corriente de CO₂.
- Posteriormente se procedió a inocular tomando con la jeringa 0.5 mL de cada cepa los tubos con caldo MRS previamente marcados con el nombre de cada cepa.
- Estos tubos se incubaron a 37 °C toda la noche.

Figura 3. Inoculación en cabina de anaerobiosis de medio MRS con cada cultivo del cepario.



Preparación de células.

- Se marcaron los tubos eppendorf en la parte superior y lateral con el nombre de la cepa y la fecha de la realización del proceso. Para cada cepa 5 tubos,

pero las que mostraron mayor potencial de degradación de glicerol 10 tubos. En total 265 tubos eppendorf.

- Los cultivos de los aislamientos con una población aproximada de 1×10^9 UFC/mL se centrifugaron a $2000 \times g$ durante 7 minutos. El sobrenadante se descartó por inversión.
- Al precipitado se agregó $800\mu\text{L}$ caldo MRS y $200 \mu\text{L}$ de glicerol previamente esterilizado y se homogenizó por medio de vortex.
- Se dispusieron en una gradilla especial para tubos eppendorf y se introdujeron en un freezer a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ en el laboratorio central de investigaciones de la facultad de salud de la universidad.

Figura 4. Crioconservación del cepario a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$



Anexo E. Prueba de fermentación de azúcares

Las pruebas bioquímicas se realizaron para analizar la fermentación de los siguientes azúcares: xilosa, sacarosa, maltosa, lactosa y glucosa. También se analizaron los siguientes alcoholes: manitol y glicerol.

Preparación base de azúcares

- Preparar la base de azúcares teniendo en cuenta que para 1L o 1000 mL se requieren 15g de base de azúcar cuya composición es:

Tabla 1: Composición de la base de azúcares rojo de fenol.

COMPUESTO	CANTIDAD [g/L]
Peptona proteosa	10
Extracto de carne	1
Cloruro de sodio	5
Rojo de fenol	0,018

- Luego dividir la base en diferentes Erlenmeyer, de acuerdo al número de azúcares, en este caso 7.

Tabla 2: Azúcares y alcoholes utilizados en las pruebas bioquímicas.

GRUPO FUNCIONAL	COMPUESTOS
AZUCARES	Xilosa
	Maltosa
	Lactosa
	Sacarosa
ALCOHOLES	Manitol
	Glicerol

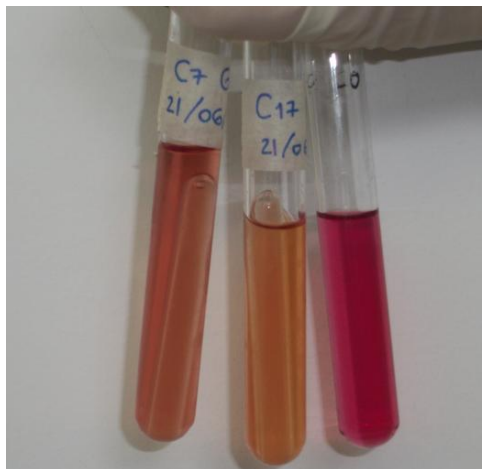
- En cada uno se adicionar 1 gramo de azúcar por cada 100 mL de base.

- Adicionar en un tubo de ensayo tapa rosca una campana de Durham para visualizar la formación de gas, y luego agregar 4 mL de base de azúcar.
- Repetir el paso anterior para cada uno de los azúcares preparados, para las 37 cepas aisladas.
- Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121°C durante 2 horas.

Siembra en la base de azúcar

- Del cepario sembrado en agar, tomar una colonia de cada cepa aislada y sembrarla en cada tubo.
- Repetir el paso anterior para cada uno de las 37 cepas aisladas, de tal forma que cada una de ellas quede sembrada en los 4 tipos de azúcares y en los 2 alcoholes.
- Incubar en microaerofilia a temperatura de 37°C durante 24 horas.
- Realizar lectura de las pruebas bioquímicas a los 5 días y a los 7 días.
- Comparar los resultados de las dos lecturas.

Figura 3. Resultados de fermentación de azúcares.

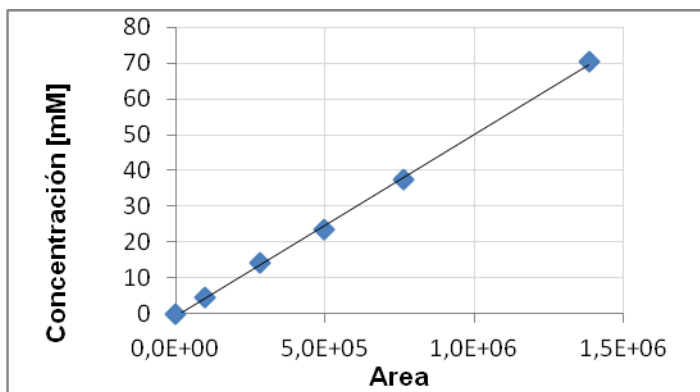


Anexo F. Curvas de calibración de HPLC

a) Curva de calibración de los patrones

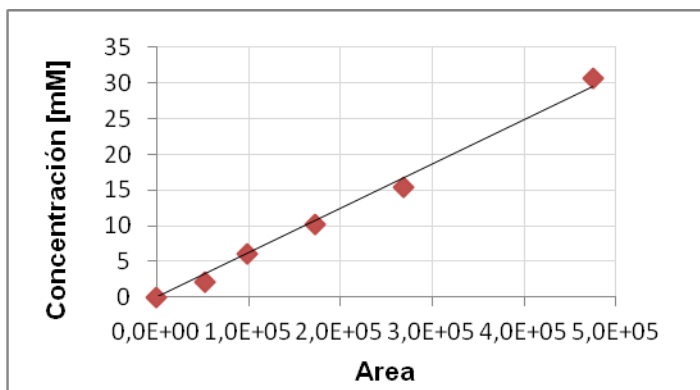
- Glicerol
- Ácido Láctico
- Etanol
- Glucosa
- Ácido acético

CURVA GLICEROL	
AREA	CONCENTRACIÓN [mM]
0	0
98838	4,691
283026	14,0726
495666	23,454
763546	37,427
1382070	70,363



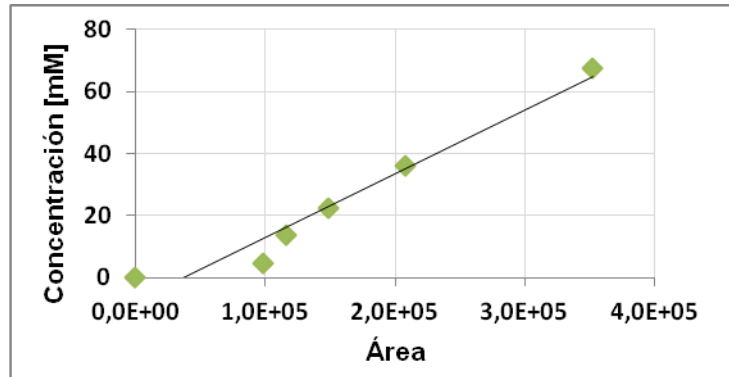
Ecuación: $y = 5E-05x - 0,5935$, $R^2 = 0,9991$

CURVA ÁCIDO LÁCTICO	
AREA	CONCENTRACIÓN [mM]
0	0
52175,7	2,0426
98553	6,1278
172466,8	10,213
268114,2	15,3395
474703	30,679



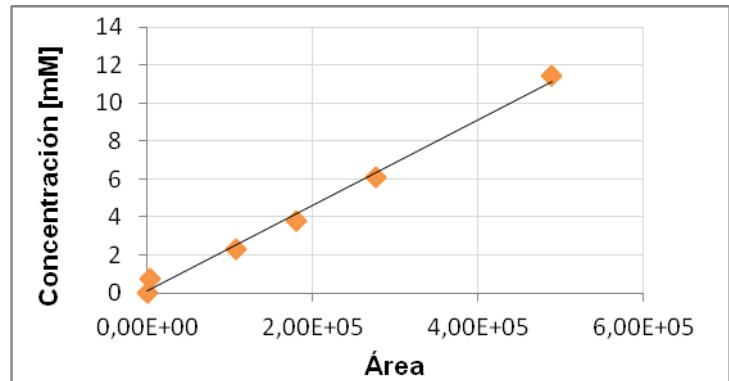
Ecuación: $y = 6E-05x$, $R^2 = 0,9924$

CONCENTRACIÓN ETANOL	
AREA	CONCENTRACIÓN [mM]
0	0
97872,9	4,515
115618	13,545
149011	22,574
208070	36,023
352228	67,723



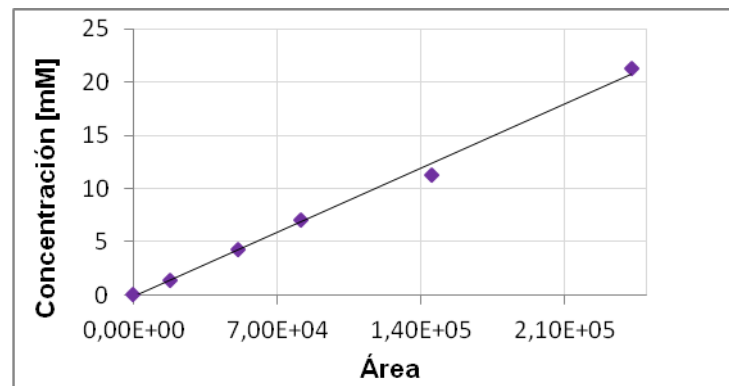
Ecuación: $y = 0,0002x - 7,5659$, $R^2 = 0,9558$

CURVA GLUCOSA	
AREA	CONCENTRACIÓN [mM]
0	0
3359,9	0,763
106835	2,289
180972	3,815
276453	6,085
489302	11,44



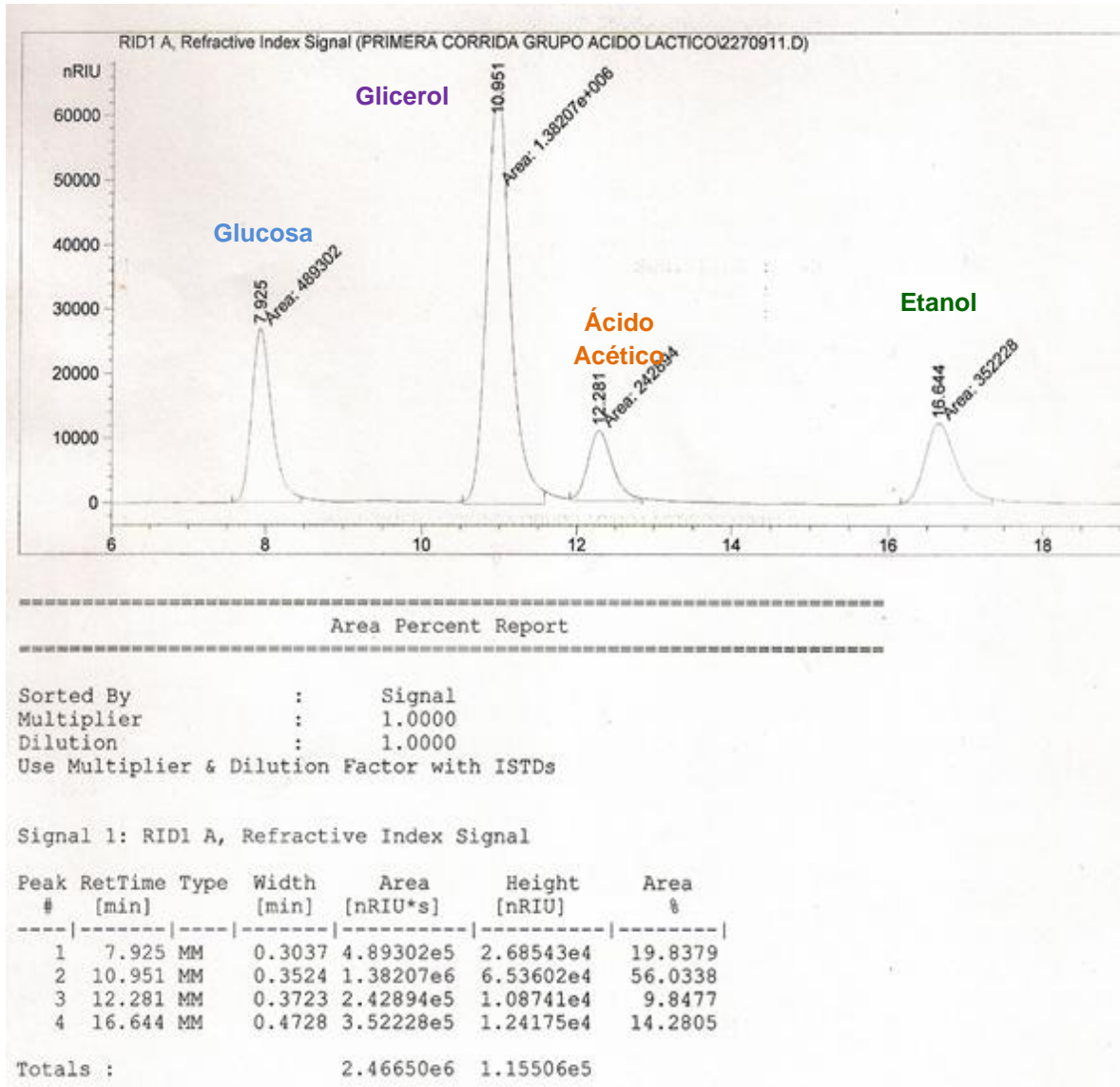
Ecuación: $y = 2E-05x + 0,0925$, $R^2 = 0,9922$

CURVA ÁCIDO ACÉTICO	
AREA	CONCENTRACIÓN [mM]
0	0
17776,9	1,42
50982,6	4,261
81882,1	7,102
145081	11,334
242894	21,305

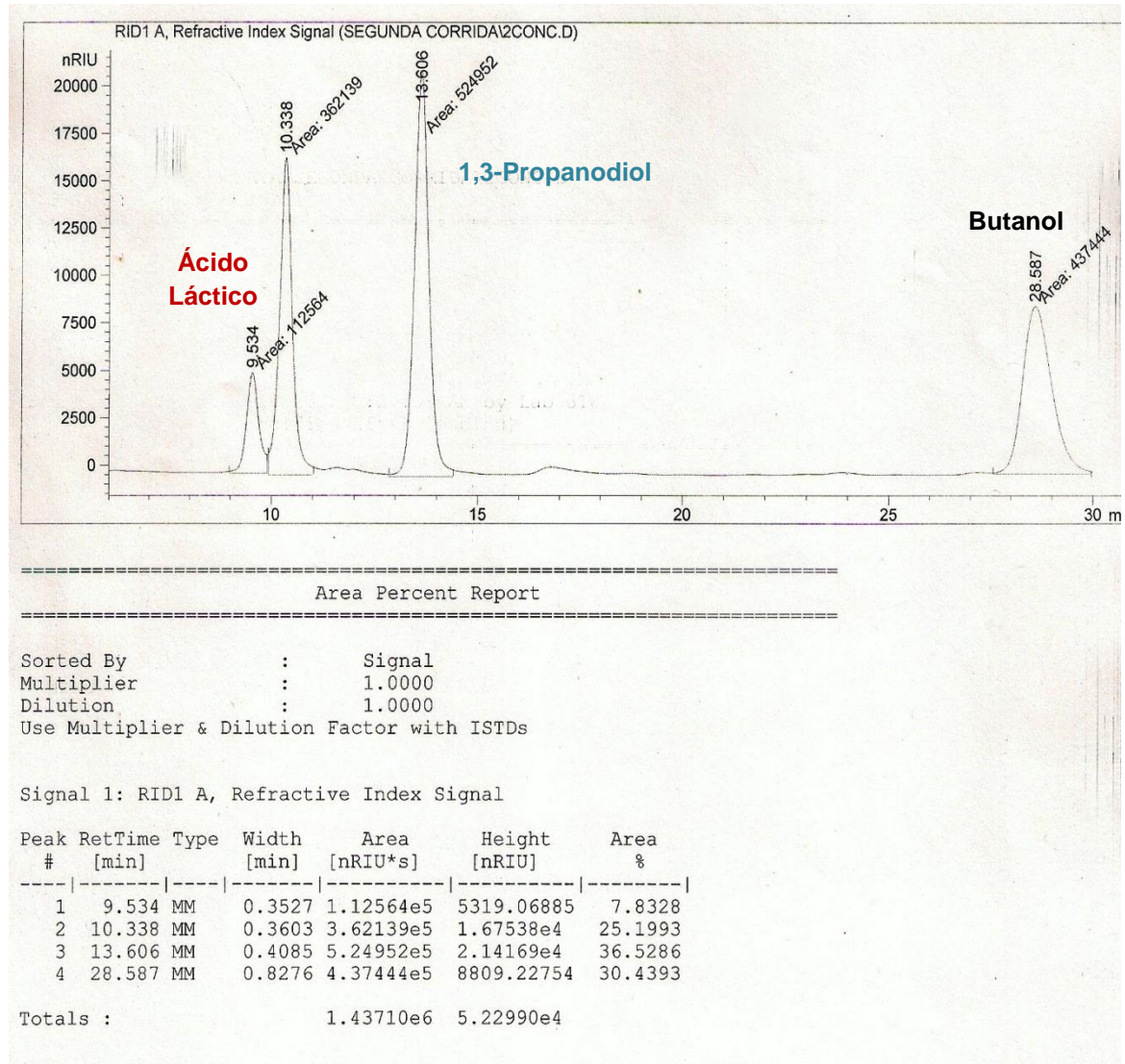


Ecuación: $y = 9E-05x - 0,1773$, $R^2 = 0,995$

b) Cromatograma curva de calibración de glucosa, glicerol, ácido acético y etanol



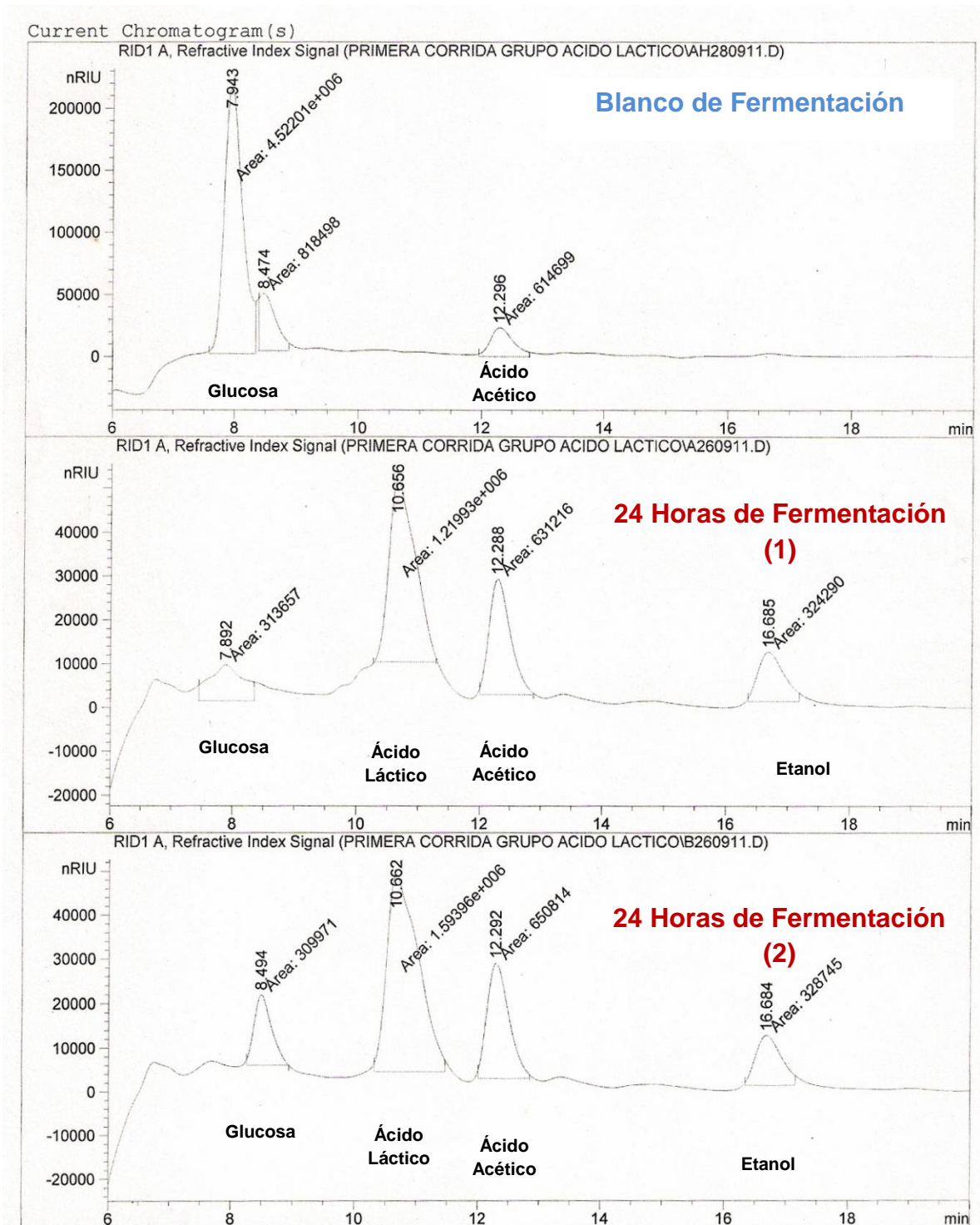
c) Cromatograma curva de calibración concentrada de ácido láctico, 1-3 propanodiol y butanol



*Para la cuantificación de ácido láctico se sumaron las dos áreas que aparecieron en el cromatograma correspondientes a la mezcla racémica de ácido láctico. No fue posible identificarlas puesto que no teníamos sustancias patrones de D y L ácido láctico puro.

* No se realizó la curva de calibración para 1,3-propanodiol ni butanol, puesto que no se detectaron como productos de fermentación.

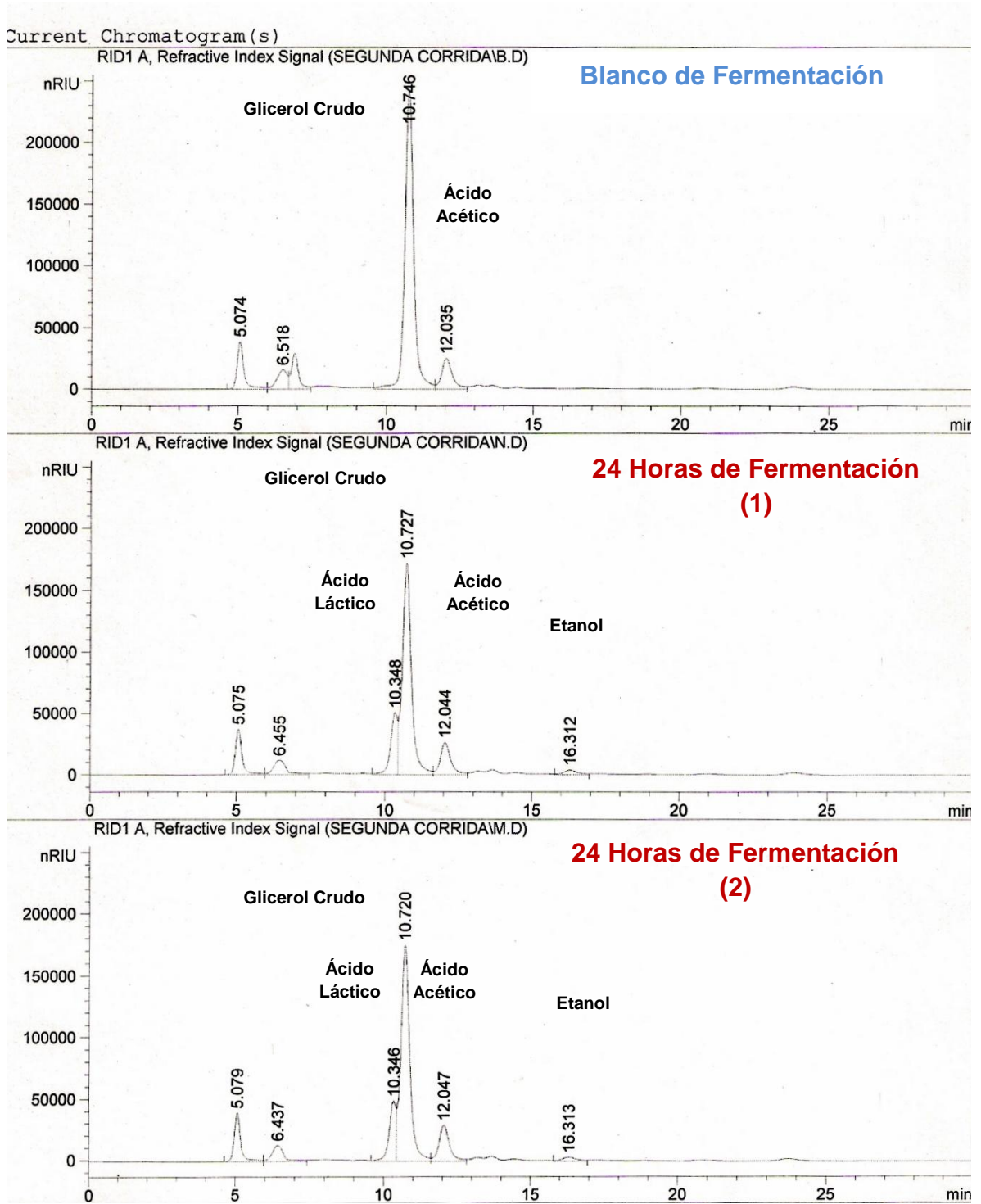
Anexo G. Cromatogramas de fermentación anaeróbica de glucosa a las 24 horas por *Lactobacillus* CYP4



Datos de Integración de fermentación anaeróbica de glucosa crudo a las 24 horas
por *Lactobacillus* CYP4

Integration Results							
Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal (PRIMERA CORRIDA GRUPO ACIDO LACTICO\AH280911.I)							
Peak #	Time [min]	Type	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Width [min]	Start [min]	End [min]
1	7.943	MM	4.52201e6	2.17285e5	0.3469	7.586	8.347
2	8.474	MM	8.18498e5	4.61467e4	0.2956	8.395	8.881
3	12.296	MM	6.14699e5	2.33107e4	0.4395	11.956	12.782
Signal 2: RID1 A, Refractive Index Signal (PRIMERA CORRIDA GRUPO ACIDO LACTICO\A260911.D)							
Peak #	Time [min]	Type	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Width [min]	Start [min]	End [min]
1	7.892	MM	3.13657e5	8243.27148	0.6342	7.457	8.359
2	10.656	MM	1.21993e6	4.14067e4	0.4910	10.273	11.292
3	12.288	MM	6.31216e5	2.62562e4	0.4007	12.005	12.879
4	16.685	MM	3.24290e5	1.12328e4	0.4812	16.358	17.184
Signal 3: RID1 A, Refractive Index Signal (PRIMERA CORRIDA GRUPO ACIDO LACTICO\B260911.D)							
Peak #	Time [min]	Type	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Width [min]	Start [min]	End [min]
1	8.494	MM	3.09971e5	1.58245e4	0.3265	8.266	8.946
2	10.662	MM	1.59396e6	4.45892e4	0.5958	10.321	11.471
3	12.292	MM	6.50814e5	2.60413e4	0.4165	12.005	12.846
4	16.684	MM	3.28745e5	1.14054e4	0.4804	16.342	17.151

Anexo H. Cromatogramas de fermentación aeróbica de glicerol crudo a las 24 horas por *Lactobacillus* CYP4



Datos de Integración de fermentación aeróbica de glicerol crudo a las 24 horas
por *Lactobacillus* CYP4

=====
Integration Results
=====

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal (SEGUNDA CORRIDA\B.D)

Peak #	Time [min]	Type	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Width [min]	Start [min]	End [min]
1	5.074	BV	6.21163e5	3.86996e4	0.2348	4.626	5.987
2	6.518	VV	3.78356e5	1.59185e4	0.3637	5.987	6.711
3	6.910	VV	4.92381e5	2.93754e4	0.2517	6.711	7.455
4	10.746	VV	5.07213e6	2.42777e5	0.3129	9.560	11.652
5	12.035	VV	6.41167e5	2.52058e4	0.3745	11.652	12.755

Signal 2: RID1 A, Refractive Index Signal (SEGUNDA CORRIDA\N.D)

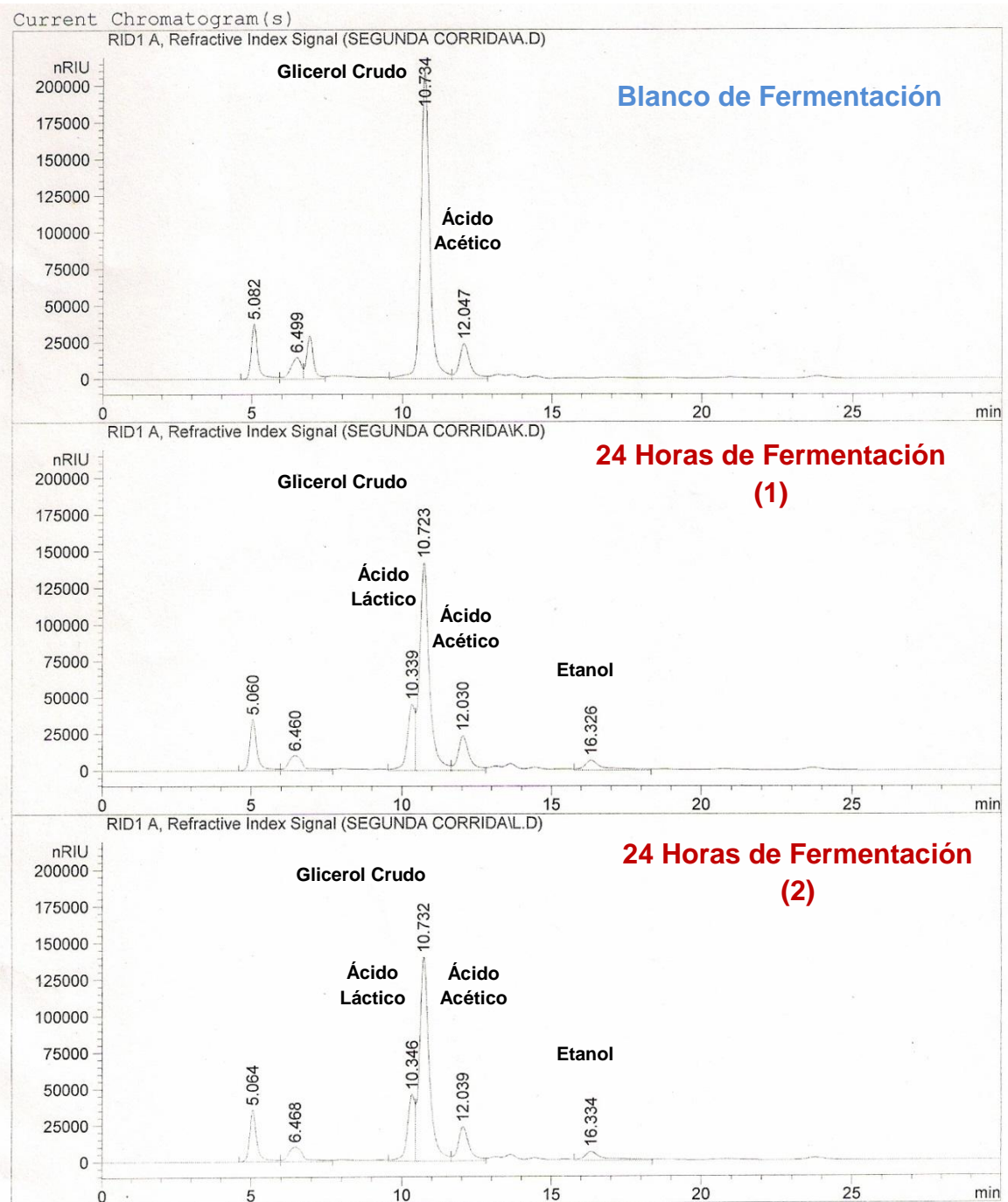
Peak #	Time [min]	Type	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Width [min]	Start [min]	End [min]
1	5.075	BV	5.92472e5	3.69715e4	0.2388	4.612	5.974
2	6.455	VV	3.66185e5	1.17413e4	0.4848	5.974	7.450
3	10.348	VV	8.39690e5	5.06604e4	0.2495	9.582	10.452
4	10.727	VV	3.68973e6	1.71823e5	0.3153	10.452	11.636
5	12.044	VV	6.58652e5	2.61088e4	0.3764	11.636	12.817
6	16.312	VV	1.34244e5	3828.68945	0.5084	15.781	16.970

Signal 3: RID1 A, Refractive Index Signal (SEGUNDA CORRIDA\M.D)

Peak #	Time [min]	Type	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Width [min]	Start [min]	End [min]
1	5.079	BV	6.05177e5	3.95078e4	0.2262	4.640	5.962
2	6.437	VV	3.58350e5	1.29775e4	0.4258	5.962	7.421
3	10.346	VV	7.89459e5	4.90432e4	0.2396	9.585	10.441
4	10.720	VV	3.74122e6	1.75406e5	0.3180	10.441	11.615
5	12.047	VV	7.29661e5	2.93892e4	0.3717	11.615	12.825
6	16.313	VV	1.11266e5	3201.83350	0.5091	15.786	16.948

=====

Anexo I. Cromatogramas de fermentación anaeróbica de glicerol crudo a las 24 horas por *Lactobacillus* CYP4

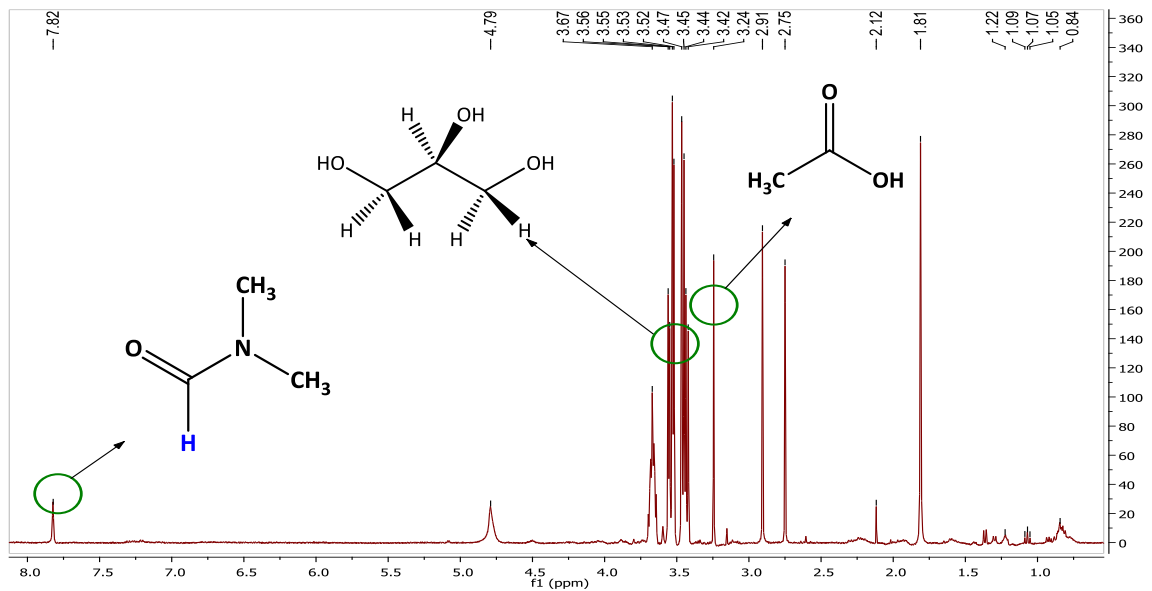


Datos de Integración de fermentación anaeróbica de glicerol crudo a las 24 horas
por *Lactobacillus* CYP4

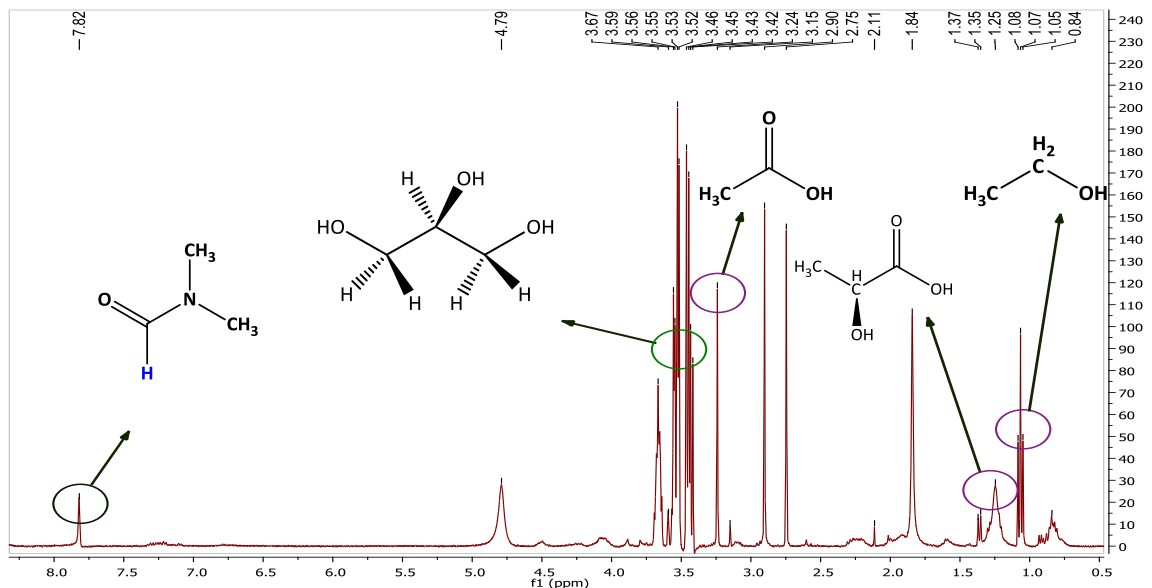
Integration Results							
Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal (SEGUNDA CORRIDA\A.D)							
Peak #	Time [min]	Type	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Width [min]	Start [min]	End [min]
1	5.082	BV	5.72002e5	3.74173e4	0.2302	4.640	5.931
2	6.499	VV	3.53315e5	1.47015e4	0.3841	5.931	6.713
3	6.917	VV	4.65748e5	2.92822e4	0.2417	6.713	7.438
4	10.734	VV	4.33747e6	2.09034e5	0.3112	9.557	11.650
5	12.047	VV	6.03703e5	2.39117e4	0.3723	11.650	12.831
Signal 2: RID1 A, Refractive Index Signal (SEGUNDA CORRIDA\K.D)							
Peak #	Time [min]	Type	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Width [min]	Start [min]	End [min]
1	5.060	BV	5.81147e5	3.48129e4	0.2509	4.597	5.977
2	6.460	VV	3.55610e5	1.00759e4	0.5543	5.977	7.717
3	10.339	VV	7.76321e5	4.51894e4	0.2566	9.542	10.449
4	10.723	VV	3.22026e6	1.42033e5	0.3336	10.449	11.634
5	12.030	VV	5.96932e5	2.34749e4	0.3744	11.634	12.792
6	16.326	VV	2.88708e5	6520.65723	0.6116	15.749	18.334
Signal 3: RID1 A, Refractive Index Signal (SEGUNDA CORRIDA\L.D)							
Peak #	Time [min]	Type	Area [nRIU*s]	Height [nRIU]	Width [min]	Start [min]	End [min]
1	5.064	BV	5.90761e5	3.54333e4	0.2464	4.612	5.985
2	6.468	VV	3.50710e5	1.00447e4	0.5499	5.985	7.706
3	10.346	VV	7.88251e5	4.57054e4	0.2530	9.552	10.459
4	10.732	VV	3.18496e6	1.39834e5	0.3348	10.459	11.644
5	12.039	VV	6.00196e5	2.35014e4	0.3757	11.644	12.800
6	16.334	VV	2.73736e5	6136.61865	0.6155	15.763	18.373

Anexo J. Espectros de ^1H -RMN (400 MHz, HDO) para los metabolitos de fermentación de *Lactobacillus* CYP4 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469

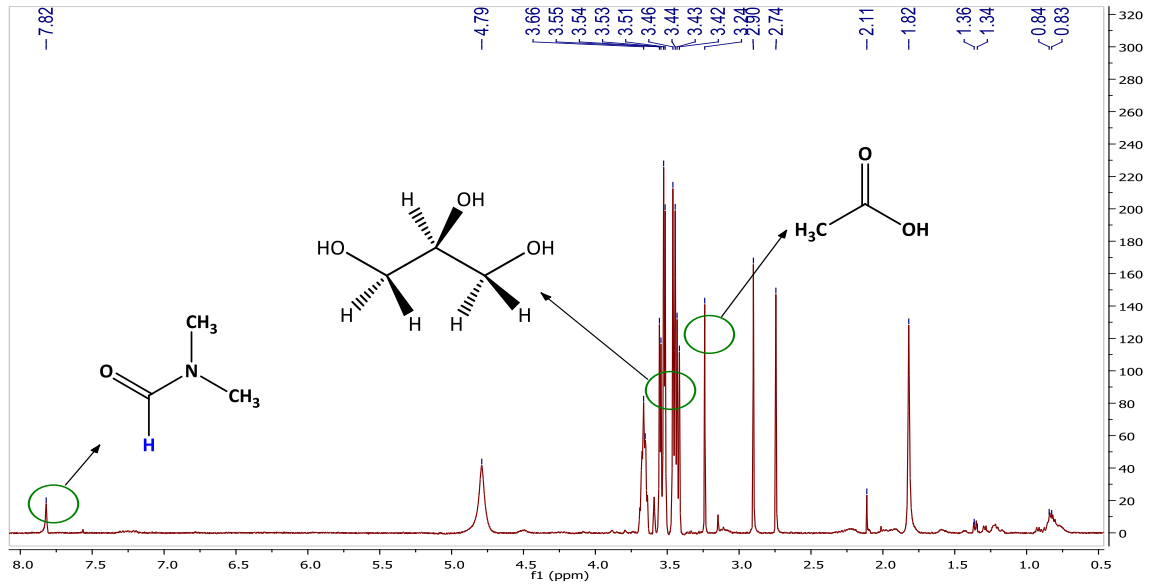
Tiempo 0 horas de fermentación anaeróbica de glicerol crudo por *Lactobacillus* CYP4



Tiempo 24 horas de fermentación anaeróbica de glicerol crudo por *Lactobacillus* CYP4



Tiempo 0 horas de fermentación aeróbica de glicerol crudo por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469



Tiempo 24 horas de fermentación aeróbica de glicerol crudo por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469

