

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

PRODUCCIÓN DE BIOBUTANOL POR *CLOSTRIDIUM SP A*
PARTIR DE GLICEROL

TRABAJO ESCRITO CORRESPONDIENTE A LA OPCIÓN DE TITULACIÓN:
CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

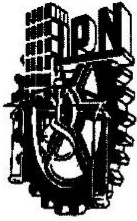
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTA:
GUADALUPE TONANTZIN DE DIOS FIGUEROA

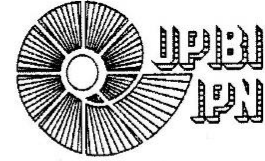
DIRIGIDA POR:

DR. EDGAR SALGADO MANJARREZ

Ciudad de México a, 14 de Junio del 2017



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA


SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA

ACTA DE TRABAJO ESCRITO


En la Ciudad de México el día 9 de Junio del 2017, siendo las 10:45 se reunieron los integrantes de la Comisión de Evaluación para Opción Curricular con el fin de revisar el trabajo escrito titulado: Producción de Biobutanol por *Clostridium sp* a partir de glicerol que presenta la alumna Guadalupe Tonantzin de Dios Figueroa con número de boleta 2013620079, aspirante a Ingeniería Biotecnológica.

Después de intercambiar opiniones los integrantes de la Comisión de Evaluación manifiestan APROBAR EL TRABAJO ESCRITO, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes para la opción curricular de titulación.

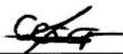
COMISIÓN REVISORA.



Dr. Edgar Salgado Manjarrez
Director del proyecto



Dra. Elyia Inés García Peña
Evaluadora



M. en C. César Agustín Jiménez
Sierra
Evaluador



Jonás Martínez Limón
Director de Programa Académico

Autorización de uso de obra

Instituto Politécnico Nacional
P r e s e n t e

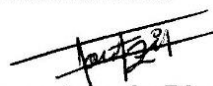
Bajo protesta de decir verdad el que suscribe *Guadalupe Tonantzin de Dios Figueroa*, manifiesto ser autora y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada *Producción de Biobutanol por Clostridium sp a partir de glicerol* en adelante "La Tesis" y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales "La Tesis" por un periodo de **1 año** contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a "El IPN" de su terminación.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis".

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de "La Tesis", manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de "La Tesis", por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de "La Tesis" o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

México, D. F., 14 de Junio del 2017 .

Atentamente



Guadalupe Tonantzin de Dios Figueroa

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos

Por inspirarme, por ser los mejores Abel, Itzel, Jessica Sánchez, Jessica Trejo, Solecito, Fanny, Abbi, Verito, Pedrito. A mi incondicional Eduardo Martín (Oliver). Los amo, UPIBI no hubiera sido la misma sin ustedes.

A mis profesores

Por ser guías constantes, en especial al Dr. Edgar Salgado por su apoyo, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la confianza para trabajar en él.

A mi familia

Por cuidarme y apoyarme siempre. A mis padres y a mis tíos que son como mis segundos padres. A mi más hermana que prima Eleonora por tantas risas. A las Huitrón y a los Castañeda por su generosidad, a Anita por ser como una mamá. A mis abuelos y mis abuelitas.

A mis compañeros de Laboratorio

Por todo el trabajo juntos Luisa, Aidé, Alex, Evelin, Danni, Tapia.

A Jesús... Ruíz León

A todos aquellos que me hayan hecho sentir en casa estando tan lejos de ella.

RESUMEN

Se aisló una cepa de *Clostridium beijerinckii* a partir de un biofertilizante, la cual es capaz de consumir glicerol y producir butanol. Se evaluaron el crecimiento y generación de productos a diferentes concentraciones de glicerol (0, 1, 2.5, 5, 7.5 y 10%) en cultivos por lote. La velocidad de crecimiento no se vio afectada por la concentración de glicerol en 1, 2.5, 5 y 7.5%, la cual se mantuvo en valores de $0.13 \pm 0.005 \text{ h}^{-1}$, pero sí se veía afectada a concentración de 10% del sustrato (0.12 h^{-1}). El valor de la velocidad de crecimiento disminuyó a las 5 horas de cultivo, después de las cuales se vio una disminución del pH y de la velocidad de crecimiento. El pH inicial del medio fue de 6.5 y de 4.5 ± 2 al final de la fermentación, este decaimiento de pH se debió a la producción de ácidos orgánicos (acetato y butirato) en el medio de cultivo e inhibía el crecimiento bacteriano a las 12 horas. La producción de butanol inició después de las 12 horas una vez que se detenía el crecimiento. El rendimiento más alto de butanol (1.68 g/g biomasa), se obtuvo a una concentración de 10 g/L de glicerol, a concentraciones bajas de glicerol no se produjo butanol cuantificable lo cual sugeriría que la producción de butanol está ligada a la concentración del sustrato. El compuesto de mayor producción no fue butanol, sino el 1,3-propanodiol el cual también es un producto de interés industrial.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
RESUMEN.....	4
INDICE DE FIGURAS.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
Biocombustibles	8
Biodiesel y glicerol	9
Biobutanol a partir de glicerol	10
<i>Clostridium</i> como productor	11
JUSTIFICACIÓN.....	13
OBJETIVOS	14
Objetivo general	14
Objetivos específicos	14
METODOLOGÍA	15
Aislamiento de la cepa	15
Identificación de la cepa.....	15
Morfología.....	15
Tinción de Gram	15
Extracción de DNA.....	15
Caracterización de la producción de butanol.....	16
Curva tipo de densidad óptica	16
Determinación de butanol y otros solventes.....	16
RESULTADOS	18
Aislamiento de la cepa	18
Resistencia a glicerol	19
Identificación de la cepa	22
Caracterización de la producción de butanol	22
DISCUSIÓN	26
RECOMENDACIONES PARA TRABAJO FUTURO	28
CONCLUSIONES.....	29
REFERENCIAS	29

ANEXOS.....	31
Formulación del medio de cultivo.....	31
Medio de cultivo de crecimiento	31
Medio de cultivo modificado	31
Medio de producción	31
Curvas tipo	32
Curva tipo de Crecimiento	32
Curva tipo de producción de Glicerol.....	32
Curva tipo de producción de 1,3-propanodiol	33
Curva tipo de producción de Acetato	33
Curva tipo de producción de Etanol.....	34
Curva tipo de producción de butanol.....	34

INDICE DE FIGURAS

Ilustración 1. Reacción de transesterificación. Vicente (2012). obtención de biodiesel por transesterificación de aceites vegetales: nuevos métodos de síntesis.	9
Ilustración 2 Rutas metabólicas de <i>Clostridium pasteurianum</i> . Biebl (2001). Fermentation of glycerol by <i>Clostridium pasteurianum</i> - batch and continuous culture studies.	12
Ilustración 3 Morfología de las cepas (bacilos). Comparación entre medio de cultivo con glicerol (izquierda), medio sin glicerol (derecha)	18
Ilustración 4 A. Morfología colonia de A12. B. Crecimiento en placa de MS. C. Producción de CO ₂ en tubos en tubos con agar de A12. D. Producción de CO ₂ en botellas de MS.	19
Ilustración 5 Evaluación del crecimiento a concentraciones de 0, 1, 2.5, 5, 7.5 y 10% de Glicerol	19
Ilustración 6 Disminución de la velocidad de crecimiento.....	20
Ilustración 7 Comportamiento de la producción de biomasa y decaimiento del pH, en medio de cultivo a 5% de glicerol	21
Ilustración 8 Estándares de 2) Glicerol, 3)Acetato, 4) 1,3-PDO, 5)Etanol, 6) Butirato y 7)Butanol.	22
Ilustración 9 Comportamiento de la producción de compuestos a glicerol al 5%.....	23
Ilustración 10 Producción de 1,3-Propanodiol, durante las primeras 12 horas de cultivo, medio con 5% de glicerol.....	24
Ilustración 11 Producción de ácidos orgánicos, durante las primeras 12 horas de cultivo, medio de con 5% de glicerol.....	24
Ilustración 12 Producción de alcoholes en las primeras 12 horas de cultivo, medio con 5% de glicerol	25
Ilustración 13 Comportamiento en la producción en medio de cultivo con 10% de glicerol	25
Ilustración 14 Matriz con todas las reacciones posibles de la biorreacción	26

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de energía a nivel mundial aunada a los problemas ambientales actuales ha incrementado la búsqueda de fuentes de energía alternativas.

Actualmente, el 80% de la energía consumida en el mundo proviene de combustibles fósiles y el 57.7% de esta se utiliza en el sector de transporte. Los combustibles fósiles son una fuente de energía no renovable y se sabe que su uso está ligado a problemas ambientales no solo por los gases libreados durante su combustión, sino también durante su refinación. Pese a las desventajas siguen siendo utilizados dado a que representan el mayor costo-beneficio.

El cambio climático es una de las consecuencias de la acumulación de gases de efecto invernadero, México es un país que, dada su diversidad, se considera de alto riesgo ante el cambio climático. En nuestro país, el 35% de las emisiones de CO₂ a la atmósfera durante el 2014, provenía del sector transporte. Aproximadamente el 72% de la energía producida para satisfacer la demanda energética de nuestro país proviene de combustibles fósiles. (International Energy Agency IEA., 2016)

Biocombustibles

Los biocombustibles pueden definirse, de manera general, como aquellas sustancias que pueden ser utilizadas para alimentar motores de combustión interna que son obtenidas de fuentes renovables y pueden reciclar el CO₂ de su combustión a través de vías fotosintéticas. Dadas sus características pueden remplazar completa o parcialmente a los combustibles líquidos derivados del petróleo utilizados en el transporte. (Escobar, y otros, 2009). Se han clasificado en tres tipos, primera, segunda y tercera generación. Los biocombustibles de primera generación eran producidos a partir de granos comestibles como el maíz, la segunda generación eran producidos a partir de subproductos agrícolas y plantas que requerían de tierras fértiles para su crecimiento, en esta clasificación entran el bioetanol y biohidrógeno. Por último los de tercera generación utilizan fuentes alternativas como algas marinas, cianobacterias, aquí se incluyen el biogás, bioetanol y biobutanol, tienen la ventaja que no se necesitan tierras para la producción de biomasa. (Gaurava, Sivasankarib, Kiranc, Ninawea, & Selvinb, 2017).

Los biocombustibles presentan ciertas ventajas frente a los combustibles fósiles:

1. Proviene de fuentes renovables que pueden ser desechos de otras industrias.

2. Son biodegradables.
3. Su combustión se basa en el ciclo de carbono, es decir reutilizan el CO_2 generado durante su combustión para producir oxígeno.
4. Son más favorables para medio ambiente

Dada la importancia ambiental, las normativas y acuerdos internacionales para la disminución de gases de efecto invernadero, la aplicación de los biocombustibles crecerá en las próximas décadas. Para mejorar los rendimientos de producción es necesario su optimización para lo cual pueden utilizarse modelos matemáticos en conjunto con la utilización de herramientas de ingeniería genética.

Biodiesel y glicerol

El biodiesel ha sido el biocombustible con mayor relevancia en los últimos años. Pese a que el biodiesel es una alternativa segura, renovable y ecológica, su viabilidad económica sigue siendo un tema de preocupación.

Al incrementar el uso de biodiesel ha incrementado también los residuos generados durante su producción. El principal subproducto de la industria del biodiesel es el glicerol crudo, el cual se forma durante la reacción de transesterificación de los ácidos grasos (aproximadamente en un 10% p/p). (Almeida, Fávaro, & Quirino, 2012)

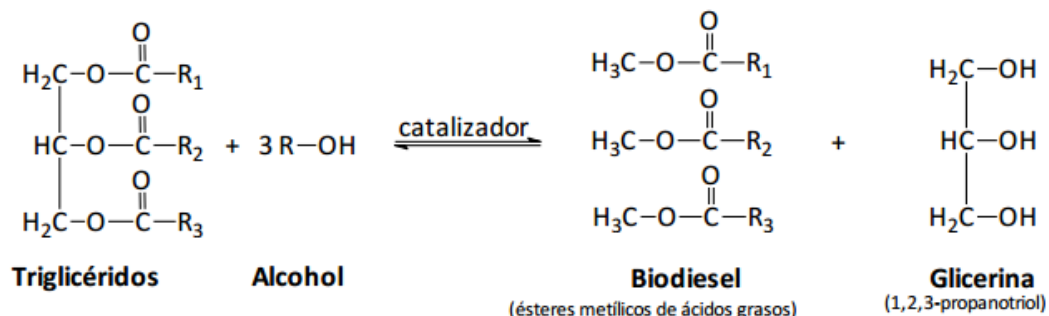


ILUSTRACIÓN 1. REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN. VICENTE (2012). OBTENCIÓN DE BIODIESEL POR TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITES VEGETALES: NUEVOS MÉTODOS DE SÍNTESIS.

Esta sobreproducción ha influido en el mercado del glicerol, cuyo precio de se ha visto disminuido debido a la sobreoferta. Esto ha provocado que sea una fuente atractiva para la producción de compuestos de alto valor agregado. El glicerol crudo generado por transesterificación ha sido caracterizado por diferentes autores. (Thompson & He, 2006) reportaron una composición de aproximadamente 50 a 60% de glicerol, 12 a 16% de álcalis (jabones e hidróxidos alcalinos), 15 a 18% de ésteres metílicos, 8 a 12% de metanol, 2 a

3% de agua y variedad de elementos tales como calcio, magnesio, potasio y azufre. Además de su bajo precio, el glicerol crudo presenta algunas ventajas para ser utilizado como materia prima, es una sustancia fácilmente digerible por Clostridios y otras bacterias, que puede ser almacenada durante largos periodo de tiempo, tiene un alto contenido de energía lo que lo hace un sustrato interesante para fermentaciones anaerobias. Una gran variedad de microorganismos son capaces de utilizarlo como fuente de carbono en tales condiciones como *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes* y *Lactobacillus reuteri* (Santibáñez, Varnero, & Bustamante, 2011)

La producción de biodiesel de tercera generación, elaborado a partir de aceites no comestibles por microalgas, genera glicerol de mayor pureza, dando un mayor número de aplicaciones para este residuo (Fan, Burton, & Zhou, 2010). Sin embargo, sigue teniendo cierto grado de impurezas siendo necesaria su purificación, que tiene un alto coste, por lo que su utilización en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética, que requieren de glicerol de alta pureza, es poco viable y es necesario buscar otras alternativas para su valorización (Santibáñez, Varnero, & Bustamante, 2011).

Biobutanol a partir de glicerol

1-Butanol (o n-butanol) es un alcohol de cadena lineal de cuatro carbonos, con fórmula molecular (C_4H_9OH) y un punto de ebullición de 118°C. El butanol es un excelente disolvente para la producción de antibióticos, vitaminas y hormonas. Una aplicación importante es su uso para reemplazar combustibles o como aditivo de ellos. Dado que tiene características similares a la gasolina puede utilizarse sin necesidad de modificaciones en los motores de combustión actuales. Su uso como aditivo en combustibles es más eficiente que el del etanol ya que tiene un mayor contenido energético, una menor volatilidad, es menos higroscópico y menos corrosivo (Yup Lee, y otros, 2008).

El 1-Butanol es producido por la fermentación de carbohidratos, por un proceso conocido como fermentación ABE, ya que los productos obtenidos son acetona, butanol y etanol, es llevado a cabo por clostridios solventogénicos. La fermentación ABE se da en dos etapas: La primera es la etapa de crecimiento en la cual se produce ácido acético y ácido butírico, la segunda etapa se caracteriza por la asimilación de ácidos en disolventes ABE, durante esta etapa el crecimiento es lento, las células acumulan gránulos y forman endosporas, también se producen dióxido de carbono e hidrógeno. (Green, 2011) Existen diferentes materias primas para la producción de biobutanol por vía fermentativa como azúcares,

glicerol o lignocelulosa. La fermentación de biobutanol a partir de glicerol crudo derivado del biodiesel ha tomado gran interés.

Clostridium como productor

El organismo más estudiado para la producción de biobutanol es *Clostridium acetobutylicum*. Sin embargo, *C. acetobutylicum* es incapaz de crecer en el glicerol, ya que no puede reoxidar el exceso de NADH₂ generado en el catabolismo glicerol (Ølshøj Jensen, Kvist, Mikkelsen, Christensen, & Westermann, 2012)

Clostridium pasteurianum es un bacilo gram positivo que se observa como gram negativo en cepas viejas, es formador de esporas y es capaz de fijar nitrógeno en presencia de molibdeno. Además puede utilizar varias fuentes de carbono (maltosa, manosa, manitol) (Whitman, 2009). A diferencia de *C. acetobutylicum*, *Clostridium pasteurianum* es capaz de utilizar el glicerol. La producción de n-butanol, 1,3 propanodiol (1,3-PDO) y etanol por *C. pasteurianum* fue descrita por (Nakas, Schaedle, Parkinson, Coonley CE, & Tanenbaum, 1983). Sin embargo, *pasteurianum* no produce acetona, como sucede en otras fermentaciones ABE.

En la Ilustración 2 se muestra la ruta metabólica utilizada por *C. pasteurianum* de acuerdo a (Biebl, 2001). El metabolismo del glicerol inicia cuando es oxidado a dihidroxiacetona por la enzima glicerol dehidrogenasa (EC 1.1.1.6), luego es fosforilado por dihidroxiacetona cinasa (EC 2.7.1.29) y la ruta prosigue por glucolisis. En el paso final para la síntesis de 1-butanol, el butiraldehído es reducido a butanol por la enzima butanol dehidrogenasa (EC: 1.1.1). Como subproductos se forman acetaldehído y butirilfosfato. El acetaldehído es reducido a etanol, mientras que el butirilfosfato es desfosforilado a butirato. El glicerol es paralelamente convertido a 3-hidroxiopropionaldehído y reducido a 1,3-propanodiol.

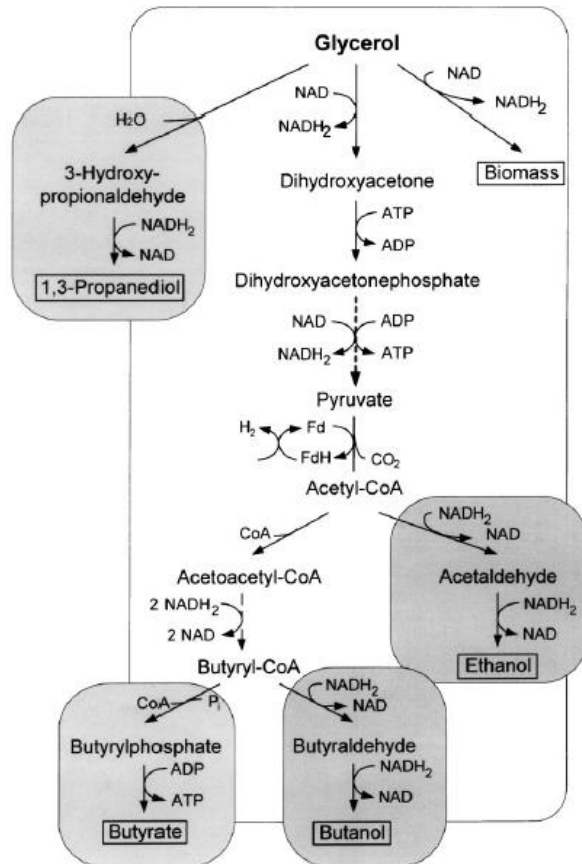


ILUSTRACIÓN 2 RUTAS METABÓLICAS DE *CLOSTRIDIUM PASTEURIANUM*. BIEBL (2001). FERMENTATION OF GLYCEROL BY *CLOSTRIDIUM PASTEURIANUM* - BATCH AND CONTINUOUS CULTURE STUDIES.

Los factores ambientales que determinan el uso de una u otra ruta metabólica no han sido lo suficientemente estudiados. (Dabrock , Bahl, & Gottscha, 1994) reportaron que el 1,3 propanodiol se produce en mayores cantidades que el butanol y que la limitación de hierro en el medio de cultivo favorece la producción de 1,3-DOP. (Ahn, Sang, & Um, 2011) obtuvieron una producción de 8.7 g/L de butanol al suplementar el medio con ácido láctico. Se ha visto que pequeñas modificaciones en el medio de cultivo desvían las rutas metabólicas, (Biebl, 2001) reporta que ligeros cambios como la concentración de hierro y cambios en el pH, en el medio desviaban la producción de butanol como producto principal a 1,3-DOP como producto principal. Como se comentó anteriormente, *C. acetobutylicum* tiene la enzima butanol dehidrogenasa por lo cual puede producir butanol, sin embargo, no tiene la enzima glicerol dehidrogenasa, por lo cual es incapaz de crecer en glicerol. Otros clostridios capaces de producir butanol a partir de glicerol son *C. arbusti*, *C. oryzae*, *C. botulinum*, *C. tyrobutyricum*. (www.genome.jp, 2017).

JUSTIFICACIÓN

La creciente demanda energética, el aumento e inestabilidad de precios de los combustibles fósiles y la necesidad de nuevos combustibles que tengan un menor impacto ambiental. Los problemas ambientales actuales (contaminación del aire, suelo y agua) ponen en riesgo la diversidad ecológica, la salud y la economía de los mexicanos.

El biobutanol es una alternativa al uso de combustibles fósiles, el cual puede utilizarse como aditivo de gasolinas o como combustible por sí mismo. Los biocombustibles se producen a partir recursos renovables y son capaces de reutilizar el CO_2 producto de su combustión representando una ventaja ecológica. El glicerol es un subproducto que se genera en grandes cantidades durante el proceso de obtención del biodiésel a partir de grasas y aceites. En los últimos años, debido al aumento de la producción de biodiesel se ha considerado al glicerol como un desecho, cuya sobre producción en los próximos años podría representar un problema. Por tanto es necesario la búsqueda de nuevos usos a esta materia prima.

El presente trabajo tiene como objeto evaluar la producción de biobutanol por *Clostridium sp* a partir de glicerol. Permitirá obtener datos para mejorar la producción y/o modificación de la cepa así como datos de producción de biobutanol a nivel laboratorio que posteriormente podrían ser escalados a nivel industrial.

Se propone optimizar el medio de cultivo y caracterizar la cepa a partir de cinéticas de crecimiento.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de *Clostridium sp.* para la producción de butanol a partir de glicerol

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar una cepa de *Clostridium sp.* capaz de crecer sobre glicerol
- Caracterizar la cepa a partir de cultivos en lote para evaluar su tolerancia al glicerol y el rendimiento de butanol

METODOLOGÍA

MEDIOS DE CULTIVO

AISLAMIENTO DE LA CEPA

1 mL del biofertilizante Microsoil fue diluido en 9 mL de agua destilada estéril, fue calentado a 80°C por 10 min para eliminar todos aquellos microorganismos no formadores de esporas, y se tomaron 5 mL para inocular botellas serológicas de 30 mL con medio de cultivo de crecimiento (ver anexos), el oxígeno fue desplazado utilizando gas nitrógeno.

Del crecimiento obtenido en las botellas se tomaron muestras que se diluyeron en agua destilada estéril, con estas diluciones se inocularon nuevas botellas serológicas con medio de cultivo modificado (ver anexos)

Del crecimiento se tomaron muestras para ser observadas al microscopio y se seleccionaron aquellas botellas cuyo crecimiento coincidieran con la morfología de bacilos característica de *Clostridium*.

IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA

La cepa fue identificada por su morfología al microscopio, por tinción de Gram y se extrajo el DNA para enviarlo a secuenciar.

MORFOLOGÍA

Se tomaron muestras de botellas serológicas, se colocaron en un portaobjetos, se añadió lugol y se tiñeron con azul de lactofenol y se observaron al microscopio.

TINCIÓN DE GRAM

Clostridium es un bacilo gram positivo, de tal manera que se realizó la tinción para su identificación. Se realizó un frotis de las colonias aisladas, se añadió cristal violeta y se dejó actuar por 1 minuto, se lavó el frotis, se añadió lugol y se dejó actuar por 1 minuto, se lavó, se añadió alcohol-acetona por 30 segundos, se lavó inmediatamente con agua, se tiñó con safranina 30 segundos, se lavó y se dejó secar. Se observó al microscopio.

EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo por el método de extracción Fenol-Cloroformo. Se tomó 1mL de una botella serológica con crecimiento y se adicionaron 9 mL de CTAB precalentado a 65°C, se mezcló suavemente. Se incubó por 1 hora a 65°C con agitación

constante. Los tubos se dejaron enfriar y se adicionaron 4.5 mL de cloroformo:octanol (24:1), se mezcló por 5-10 minutos. Se centrifugó por 10 minutos a 3200 rpm a temperatura ambiente. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo de 15 mL y se adicionaron 5 mL de cloroformo:octanol. Se centrifugó a 3200 rpm por 10 minutos, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo, se adicionaron 6 mL de isopropanol, se mezcló por inversión. Se centrifugó a 3200 rpm por 10 minutos para obtener la pastilla de DNA. El DNA se colocó en un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se resuspendió en 1 mL de TE. Se mantuvo en refrigeración toda la noche a 4°C.

Se añadió 1mL de una solución fenol:cloroformo (1:1) se mezcló suavemente. Se centrifugó a 3200 rpm durante 10 minutos. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, se añadió 1mL de cloroformo:octanol, se centrifugó a 3200 rpm durante 10 minutos. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, el DNA se precipitó añadiendo 50 µL de NaCl 5M y después 1 mL de etanol absoluto. Se mezcló suavemente por inversión. Se centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto para recuperar la pastilla de DNA, se añadieron 2 mL de solución de lavado. Se dejó la pastilla de 10-20 minutos agitando de manera continua. Se centrifugó a 12000 rpm 1 minuto para recuperar la pastilla, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Se adicionó 100 µL de TE hasta que se disolvió la pastilla. Se tapó el tubo y se almacenó a -20 °C. Las muestras de DNA obtenidas se mandaron secuenciar a la empresa RTL Genomics.

CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BUTANOL

Se realizaron cinéticas a diferentes concentraciones de glicerol (0, 1, 2.5, 7.5 y 10%) en botellas serológicas, se tomaron muestras de 2mL cada dos horas, para determinar la biomasa por densidad óptima (DO) a 595 nm, se centrifugaron para eliminar la biomasa y se almacenaron a -4°C para su posterior análisis por cromatografía de alta eficiencia. El pH se midió con un potenciómetro, previamente calibrado con buffers de pH 4, 7 y 9.

CURVA TIPO DE DENSIDAD ÓPTICA

Se realizó un cultivo lote y se tomaron 2 mL de muestra cada dos horas, las muestras se leyeron a 595 nm la densidad celular se obtuvo por peso seco, se realizó la curva tipo relacionando los gramos de bacterias por mililitro con las lecturas de absorbancia.

DETERMINACIÓN DE BUTANOL Y OTROS SOLVENTES

La determinación de compuestos se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), el equipo utilizado fue un sistema Varian ProStar con detector IR y una columna

de intercambio aniónico (aminex HPX-87H, Bio-Rad) de dimensiones 300x7.8 mm. La fase móvil utilizada fue H_2SO_4 0.005 M con un flujo de 0.6 mL/min. Las soluciones y muestras fueron filtradas con filtros millipore de 0.1 μm e inyectadas de manera manual al equipo. Los estándares se realizaron a concentraciones de 11.5, 0.75, 0.25 y 0.125 g/L para acetato, butirato, etanol y butanol, a 5, 2.5 y 1% para el 1,3-propanodiol y a concentraciones de 50, 10, 5 y 1 g/L para el glicerol. Para los estándares se utilizó agua miliQ y se sonicaron por 15 minutos.

RESULTADOS

AISLAMIENTO DE LA CEPA

Para el aislamiento, se seleccionaron aquellas cepas que fueran bacilos gram positivos. El crecimiento en condiciones anaerobias se realizó en botellas serológicas de 100 mL, el oxígeno se desplazó con gas nitrógeno.



ILUSTRACIÓN 3 MORFOLOGÍA DE LAS CEPAS (BACILOS). COMPARACIÓN ENTRE MEDIO DE CULTIVO CON GLICEROL (IZQUIERDA), MEDIO SIN GLICEROL (DERECHA)

El medio de cultivo tenía como única fuente de carbono glicerol. Para comprobar su consumo se crecieron las cepas en medio con y sin glicerol, únicamente se observó crecimiento en el medio con glicerol. Después de la selección, se obtuvieron dos cepas, que fueron identificadas como A12 y MS, capaces de crecer en condiciones anaerobias, de utilizar el glicerol y que producían una gran cantidad de gases. Las cepas se diferencian una de la otra, por la formación de colonias. La cepa A12 presentó crecimiento en la superficie de las placas, es decir que podía crecer tanto en condiciones aerobias como anaerobias, mientras que el crecimiento la cepa MS era en el fondo de las placas donde existe menor cantidad de oxígeno. La cepa A12 crecía solo en condiciones de microanaerobiosis de tal manera que su uso se descartó y las pruebas se realizaron únicamente con la cepa MS1

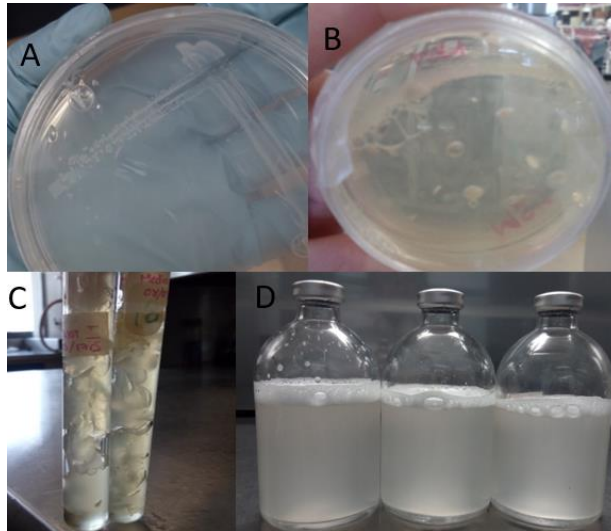


ILUSTRACIÓN 4 A. MORFOLOGÍA COLONIA DE A12. B. CRECIMIENTO EN PLACA DE MS. C. PRODUCCIÓN DE CO₂ EN TUBOS EN TUBOS CON AGAR DE A12. D. PRODUCCIÓN DE CO₂ EN BOTELLAS DE MS

RESISTENCIA A GLICEROL

El glicerol se probó a concentraciones de 0, 1, 2.5, 5, 7.5 y 10% p/v. La mayor velocidad de crecimiento se obtuvo a una concentración de 2.5% de glicerol y la menor a concentración de 10%, sin embargo la velocidad no varió significativamente frente a la concentración de glicerol.

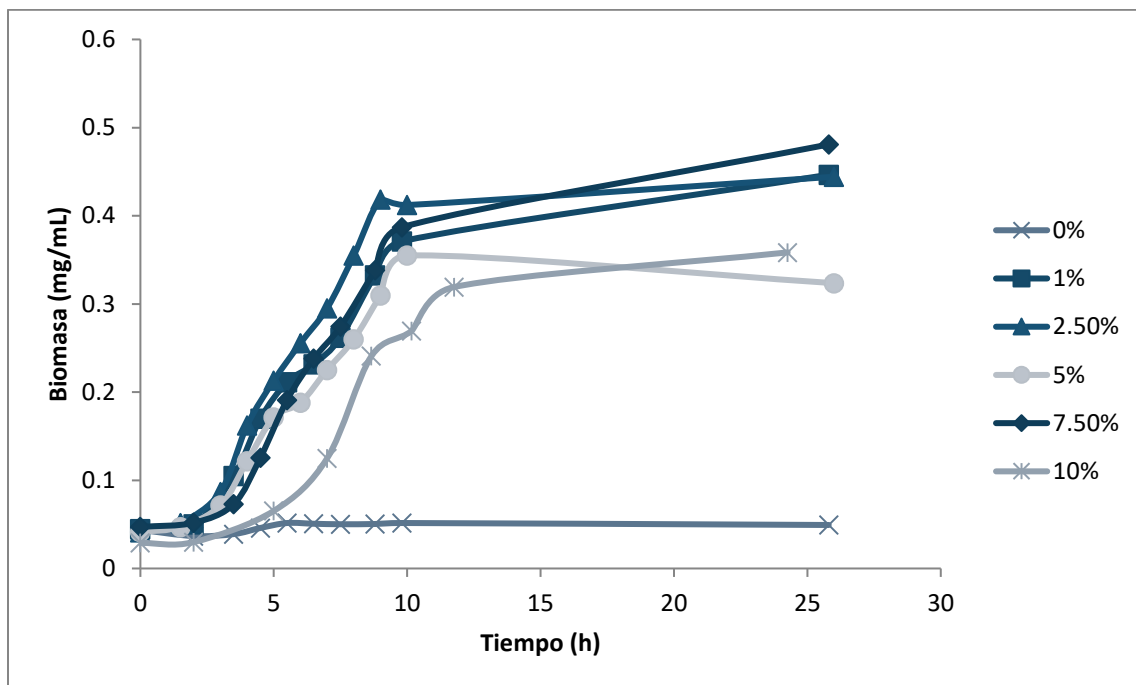


ILUSTRACIÓN 5 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO A CONCENTRACIONES DE 0, 1, 2.5, 5, 7.5 Y 10% DE GLICEROL

TABLA 1 VELOCIDADES DE CRECIMIENTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLICEROL

Concentración de glicerol (%)	Velocidad de crecimiento (h^{-1})	Tiempo de generación (h)
1	0.135	5.14
2.5	0.178	4.07
5	0.134	5.17
7.5	0.130	5.33
10	0.12	5.77

A concentraciones de 20% no se observó crecimiento. El medio sin glicerol no presentó crecimiento significativo, lo cual demuestra que la cepa utiliza el glicerol como fuente de carbono y que el crecimiento obtenido fue debido únicamente a este sustrato. Si se observa el crecimiento en una gráfica semilogarítmica se puede apreciar en todos los casos que la cepa tiene una fase de adaptación, seguida de una fase exponencial que en las primeras 4 horas crece rápidamente pero que la velocidad decae después de las 5 primeras horas de cultivo.

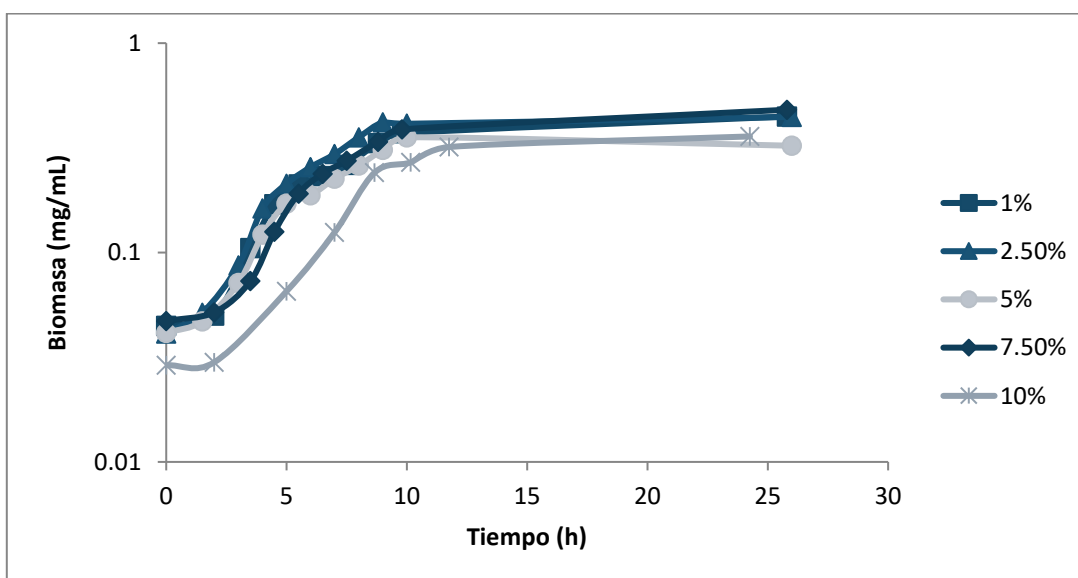


ILUSTRACIÓN 6 GRÁFICA SEMILOGARÍTMICA, DISMINUCIÓN DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

La concentración de biomasa final no varió pese a la concentración de glicerol, lo cual sugiere que existe una limitante en el crecimiento, ya sea por el agotamiento de algún cofactor o por el decaimiento del pH del medio de cultivo.

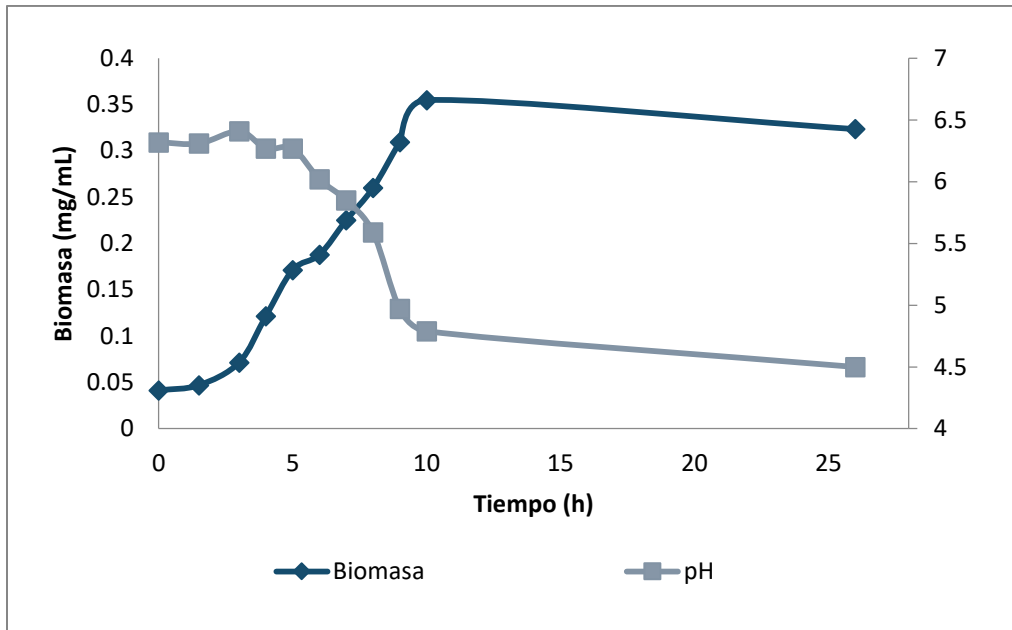


ILUSTRACIÓN 7 COMPORTAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y DECAIMIENTO DEL pH, EN MEDIO DE CULTIVO A 5% DE GLICEROL

Se observó que la concentración de glicerol afectaba la morfología celular. A concentraciones altas la cepa formaba bacilos largos, a concentraciones bajas los bacilos eran cortos.

TABLA 2 CAMBIO EN LA MORFOLOGÍA CELULAR A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLICEROL

Glicerol 0%	Glicerol 5%	Glicerol 10%

IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA

La identificación de la cepa se llevó a cabo por pirosecuenciación, realizada por la empresa RTLGenomics. Los resultados fueron los siguientes. De la cepa MS12, se obtuvo un 100% de *Clostridium beijerinckii*. De la cepa A12, se obtuvo un 100% de *Bacillus cereus*. Ambas cepas tiene características muy similares a *C. pasteurianum*, pues son un bacilos gram positivos, anaerobios, esporulados, que se encuentra en la materia orgánica y se utilizan como aditivos en biofertilizantes.

CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BUTANOL

La identificación de los productos de la fermentación se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Se montó el equipo y se establecieron las condiciones de operación las cuales fueron:

- Flujo de 0.6 mL/min
- Fase móvil: H_2SO_4 0.005M
- Columna: Columna de exclusión de intercambio aniónico.

Se utilizaron estándares de concentraciones, 11.5, 0.75, 0.25 y 0.125 g/L para acetato, butirato, etanol y butanol, 5, 2.5 y 1% para el 1,3-propanodiol y concentraciones de 50, 10, 5 y 1 g/L para el glicerol. Los tiempos de retención fueron los siguientes.

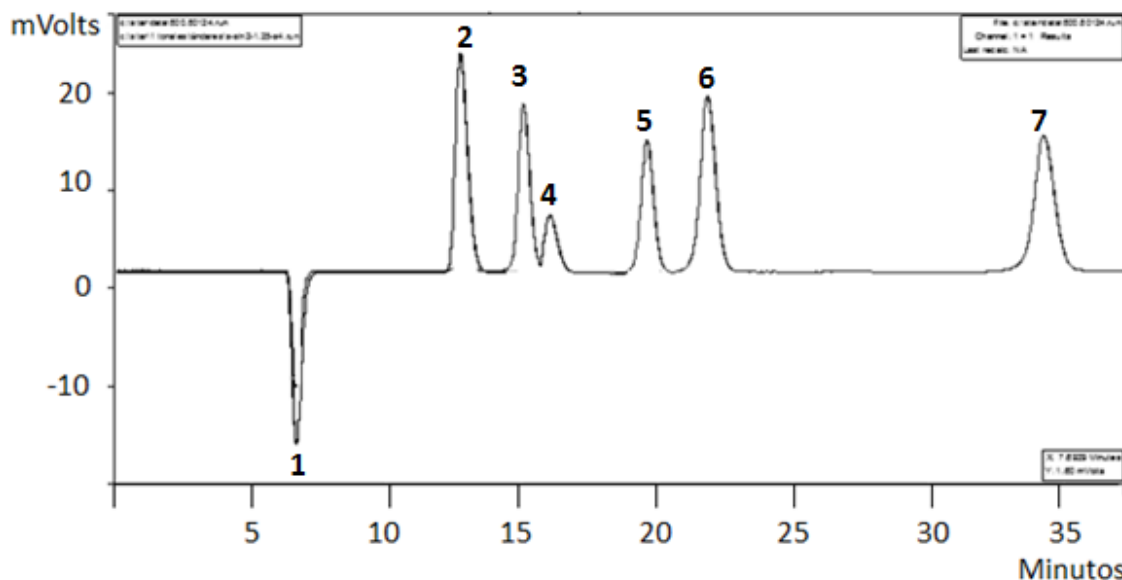


ILUSTRACIÓN 8 ESTÁNDARES DE 2) GLICEROL, 3) ACETATO, 4) 1,3-PDO, 5) ETANOL, 6) BUTIRATO Y 7) BUTANOL.

TABLA 3 TIEMPOS DE RETENCIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS DE LA FERMENTACIÓN EN COLUMNA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO A UN FLUJO DE 0.6ML/MIN

Pico	Tiempo de retención (min)	Compuesto
1	6	Agua
2	12.6	Glicerol
3	15.05	Acetato
4	15.8	1,3-Propanodiol
5	19.22	Etanol
6	21.99	Butirato
7	33.29	Butanol

No fue posible la cuantificación de glicerol, ya que existían otros compuestos que presentaban un tiempo de retención similar que provocó falsas lecturas en la concentración de glicerol presente en las muestras.

A concentraciones de 1 y 2.5% de sustrato, la producción de butanol no fue cuantificable. A continuación se muestran la producción de compuestos a concentraciones de 5 y 10% de glicerol. A 7.5% sí se obtuvo butanol pero las gráficas no se muestran.

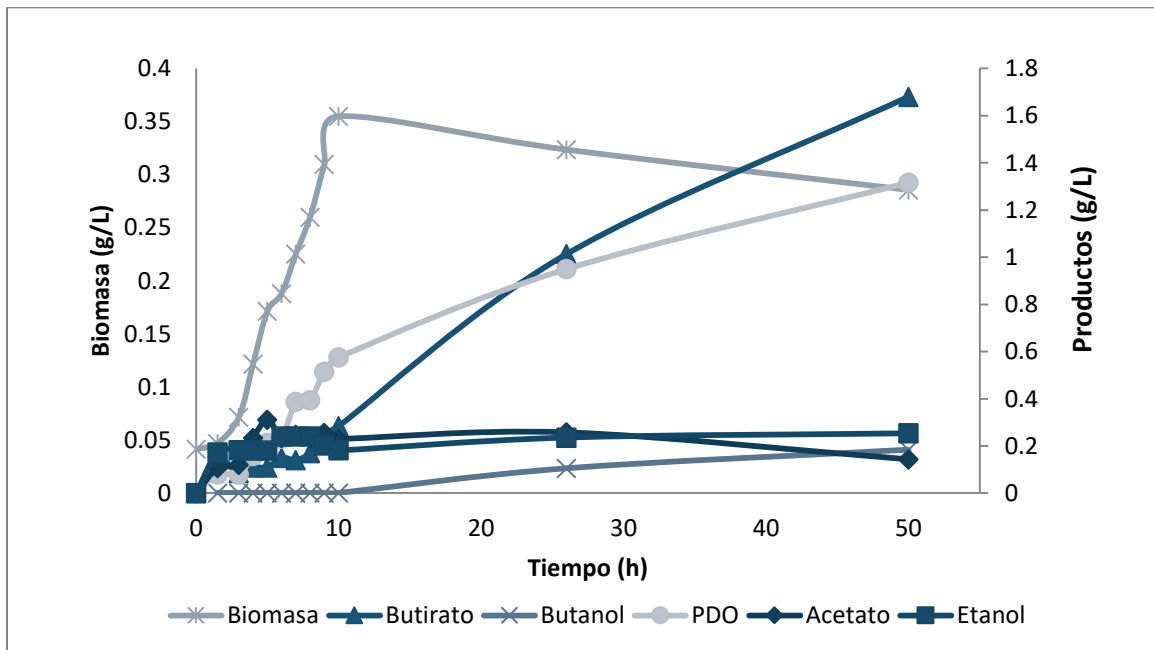


ILUSTRACIÓN 9 COMPORTAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS A GLICEROL AL 5%

A continuación se muestran las gráficas de la producción de compuestos en las primeras 12 horas de cultivo.

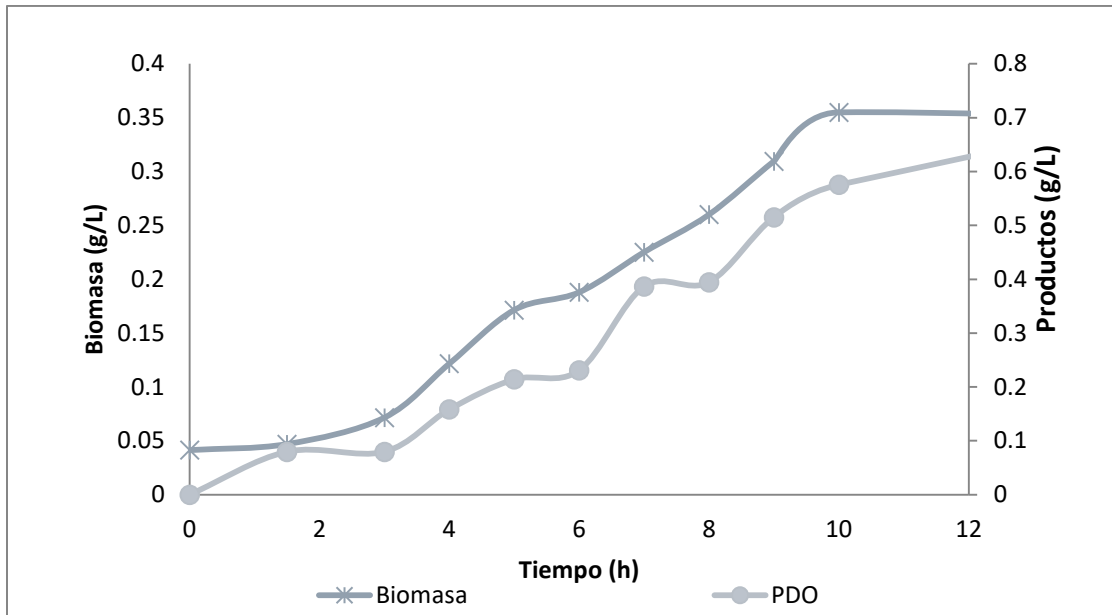


ILUSTRACIÓN 10 PRODUCCIÓN DE 1,3-PROPANODIOL, DURANTE LAS PRIMERAS 12 HORAS DE CULTIVO, MEDIO CON 5% DE GLICEROL

La producción de 1,3-PDO, en las primeras horas de cultivo está ligada a crecimiento (Figura 10), mientras que en los ácidos orgánicos, en las primeras horas se produce acetato, esta producción cesa a las 5 horas y comienza la producción de butirato que en las primeras horas se mantuvo constante (Ver Figura 11).

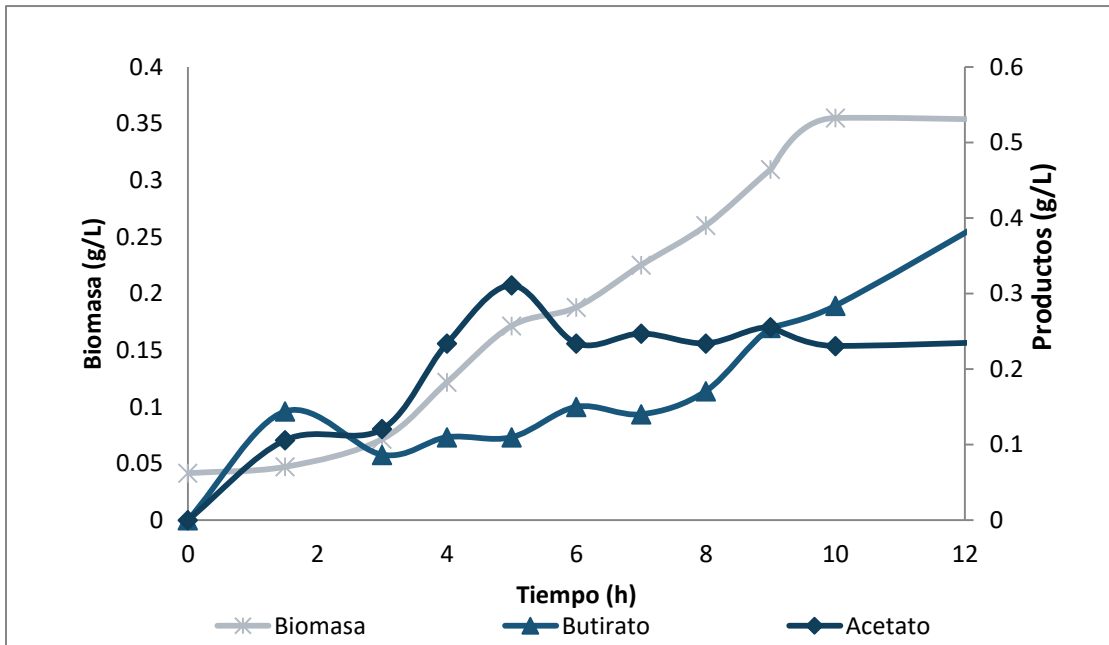


ILUSTRACIÓN 11 PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS, DURANTE LAS PRIMERAS 12 HORAS DE CULTIVO, MEDIO DE CON 5% DE GLICEROL

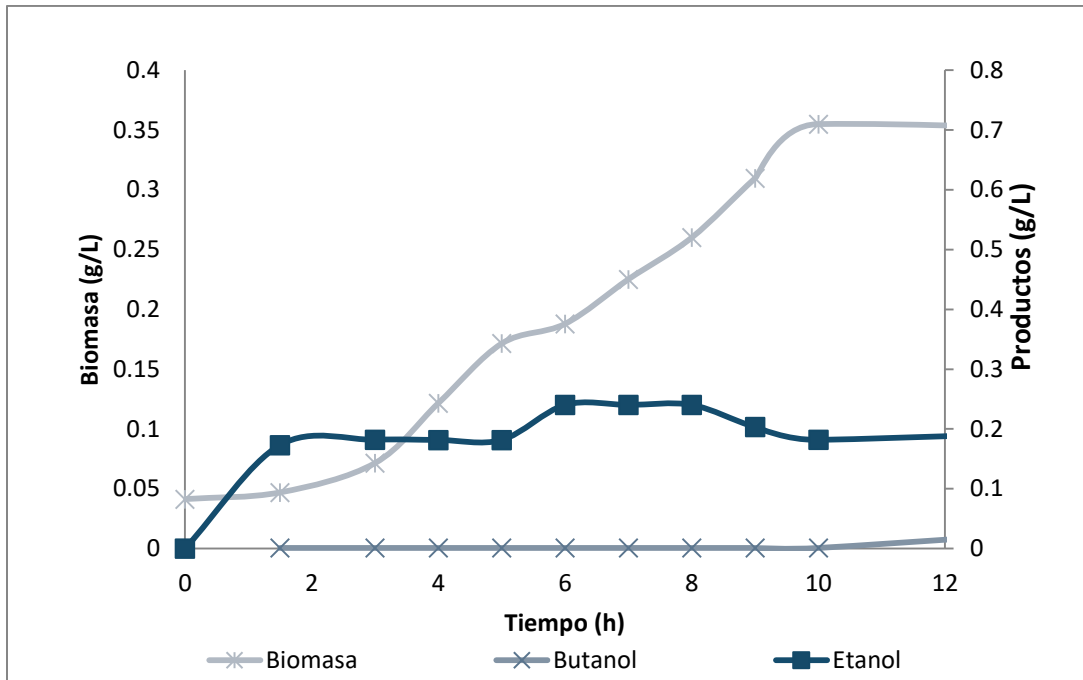


ILUSTRACIÓN 12 PRODUCCIÓN DE ALCOHOLES EN LAS PRIMERAS 12 HORAS DE CULTIVO, MEDIO CON 5% DE GLICEROL

En cuanto a la producción de alcoholes (Figura 12), tanto el etanol como el butanol, no se producen en las primeras horas de cultivo. Una vez que la cepa entra en fase estacionaria, la producción cambia (Ver figura 13), existe una gran producción de butirato, decae la concentración de biomasa, el acetato se consume y se produce butanol en pequeñas cantidades.

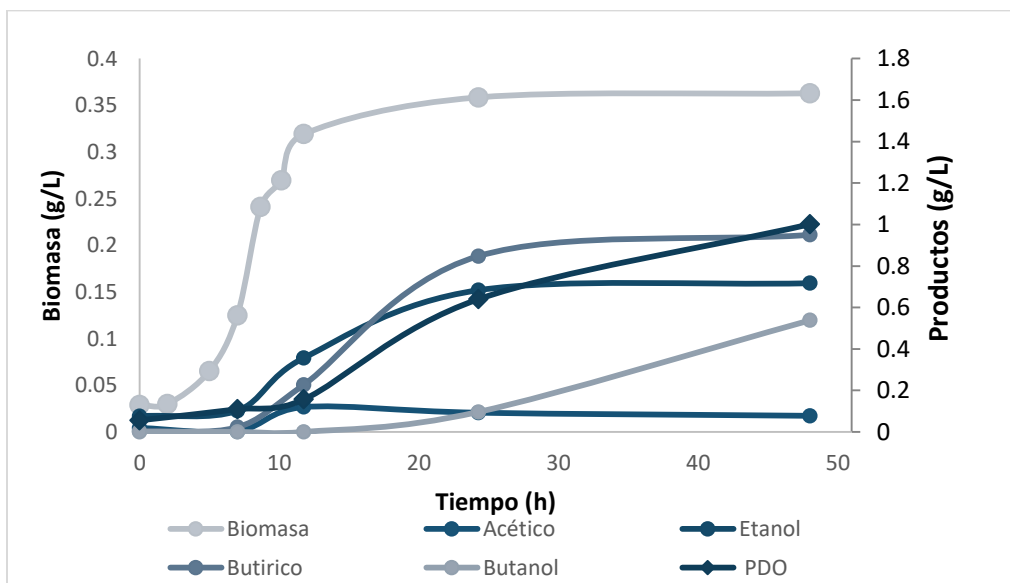


ILUSTRACIÓN 13 COMPORTAMIENTO EN LA PRODUCCIÓN EN MEDIO DE CULTIVO CON 10% DE GLICEROL

Una vez identificados los compuestos se realizó la caracterización estequiométrica, usando el programan wólffram mathematica. Se propuso una matriz elemental con los sustratos y productos de la biorreacción. Esta matriz fue resuelta por el algoritmo de Wagner para encontrar los rayos extremos que delimitan el espacio de soluciones. Así, se obtuvieron las posibles ecuaciones que satisfacen la estequiometría de la biorreacción, sin embargo no quiere decir que todas se lleven a cabo.

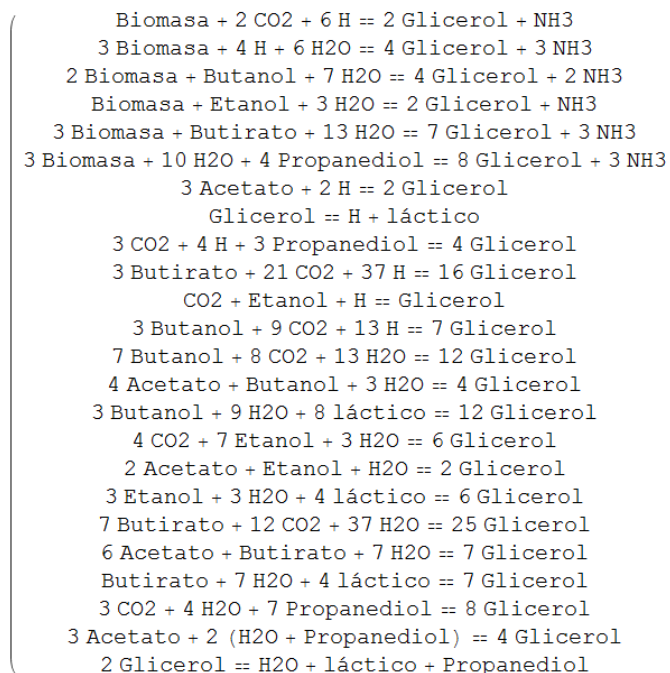


ILUSTRACIÓN 14 MATRIZ CON TODAS LAS REACCIONES POSIBLES DE LA BIORREACCIÓN

DISCUSIÓN

Algunas cepas de *Clostridium beijerinckii* han sido reportadas de ser capaces de producir butanol a partir de desechos agrícolas hidrolizados (Ziyong , Fuli , Cuiqing , & Ping, 2010) (Thaddeus , Nasib , & Blaschek, 2007) o bien a partir de azúcares simples (Sang-Hyun , y otros, 2016) pero no se han encontrado trabajos previos respecto a la producción de butanol a partir de glicerol con esta especie de *Clostridium*.

El cambio en la morfología durante la fermentación ABE ha sido ampliamente reportada en diferentes clostridios (Schuster, Goodacre, Gapes, & Young, 2001), siendo bacilos largos una característica de la fase solventogénica. En las cinéticas realizadas se veía una población mixta, es decir que contenía tanto bacilos largos como bacilos cortos, por lo cual podría suponerse que no se llegó a una completa fase solventogénica sino que el

crecimiento se detenía antes de que todas las células cambiaran su metabolismo a la producción de solventes. En cuanto al cambio de morfología debido a la concentración de glicerol en el medio de cultivo, se ha visto que diferentes especies del género *Clostridium* cambian su morfología en condiciones de estrés (Szymanowska-Powalowska, 2015) , por tanto este cambio en la morfología observado puede deberse a que a altas concentraciones de glicerol la célula se encontraba en un estado de mayor estrés.

De acuerdo a (Whitman, 2009) *C. beijerinckii* es un microorganismo nutricionalmente exigente, cuyo crecimiento requiere de vitaminas y factores de crecimiento, en este caso, dichos compuestos fueron proporcionados por el extracto de levadura. Es posible que la limitación del crecimiento se diera por el agotamiento de algún compuesto presente en el extracto de levadura, sin embargo, dado a que la composición del extracto de levadura no está químicamente definida esto no fue estudiado en el presente trabajo. Otro parámetro que presumiblemente limitó el crecimiento es el pH, el cual no fue controlado y decayó de 6.5 a 4.5, el pH final en todos los casos se encontraba entre 4.5-4.7. (Jianga, y otros, 2014) reportan que el pH óptimo para la producción de solventes por *Clostridium sp* es de 5.5, al cual la producción se incrementa hasta un 93% en comparación con aquellos cultivos en los cuales el pH no se controla. Por otro lado, la limitación del crecimiento debido al agotamiento del nitrógeno puede descartarse, ya que estequiométricamente todo el nitrógeno del medio debe ser utilizado para la producción de biomasa, es decir su relación molar es 1 a 1, la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo era de 0.03 M, lo cual generaría 2.76 g/L de biomasa, sin embargo en todos los casos la biomasa final fue menor a 0.42 g/L.

De acuerdo a (Whitman, 2009) *Clostridium beijerinckii* puede producir, además de acetato y butirato, ácido succínico, láctico, fórmico y propiónico los cuales no fueron cuantificados en el presente trabajo. El ácido láctico y propiónico podrían, debido a la similitud estructural, tener un tiempo de retención cercano al glicerol que impidió la cuantificación del mismo.

A concentraciones de glicerol de 1 y 2.5% no se obtuvo una producción de butanol cuantificable. El rendimiento producto biomasa (Y) fue 2.3 veces mayor en el cultivo a 10% de glicerol (Y=1.5) que a 5% de glicerol (Y=0.64). La aseveración de que la producción de butanol está ligada a la concentración de butanol ha sido reportada con anterioridad por (Haluska, 2010), esto podría estar relacionado con el incremento del estrés de la célula que la obliga a elegir la ruta metabólica de producción de butanol frente a otras. Dado que durante la producción alcohólicas se liberan 4 NAD y que durante la producción de ácido

orgánicos se libera ATP, es posible que debido al estrés celular, el microorganismo no requiera tanta energía para crecer y en cambio requiera de mayor cantidad de NAD ya que el glicerol es un agente reductor. Durante la producción de 1,3-Propanodiol se libera un NAD. En todos los casos el producto de mayor producción es el 1,3-Propanodiol, sin embargo, en este caso hay un mayor rendimiento producto biomasa a concentraciones de glicerol del 5% ($Y=4.6$) que a 10% ($Y=3.136$), es decir que cuando hay una mayor concentración de glicerol, el metabolismo celular prefiere la producción de 4 NAD por la producción de butanol que un solo NAD por la producción de 1,3-Propanodiol.

La cepa A12 (que no se evaluó en el presente trabajo), fue identificada como *Bacillus cereus*, según la base de datos Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG) también cuenta con las enzimas necesarias para la producción de biobutanol a partir de glicerol sin embargo, a diferencia de *C. beijerinckii* presenta toxicidad moderada.

RECOMENDACIONES PARA TRABAJO FUTURO

Se propone como trabajo futuro el mejorar el cultivo ya sea controlando el pH para evitar que se detenga el crecimiento de la biomasa o buscando si existe algún cofactor que se encuentre limitando el crecimiento, para poder optimizar la producción de butanol.

Es recomendable mejorar la técnica de HPLC variando el pH de la fase móvil así como los flujos para evitar traslapes entre picos y poder cuantificar los productos que no pudieron ser cuantificados en el presente trabajo.

La evaluación de la producción de hidrógeno por *Clostridium beijerinckii* es recomendable, dado que se ha reportado como un buen productor este biocombustible.

CONCLUSIONES

Se aisló una cepa capaz de consumir glicerol, la cual fue identificada como *Clostridium beijerinckii*. Se identificaron y cuantificaron los productos de su fermentación por HPLC, los cuales fueron 1,3-propanodiol, acetato, butirato, etanol y butanol.

Se evaluó el crecimiento a diferentes concentraciones de glicerol y se determinó la concentración de sustrato a la cual se obtiene una mayor producción de butanol.

Se determinó el rendimiento producto biomasa del butanol, más no fue posible el cálculo del rendimiento sustrato producto debido a que el consumo de glicerol no pudo ser cuantificado.

REFERENCIAS

- (9 de Diciembre de 2016). Recuperado el 19 de Febrero de 2017, de International Energy Agency IEA.: <https://www.eia.gov/beta/international/analysis.cfm?iso=MEX>
- Ahn, J.-H., Sang, B.-I., & Um, Y. (2011). Butanol production from thin stillage using *Clostridium pasteurianum*. *Bioresource Technology*, 4934-4937.
- Almeida, J., Fávoro, L., & Quirino, B. (2012). Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnology for Biofuels*, 5(48), 1-16.
- Biebl, H. (2001). Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* - batch and continuous culture studies. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 18-26.
- Dabrock, B., Bahl, H., & Gottscha, G. (1994). Parameters Affecting Solvent Production by *Clostridium pasteurianum*. *Applied and environmental microbiology*, 58(4), 1233-1239.
- Escobar, J., Lora, E., Venturini, O., Yáñez, E., Castillo, E., & Almazan, O. (2009). Biofuels: Environment, technology and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*(13), 1275–1287.
- Fan, X., Burton, R., & Zhou, Y. (2010). Glycerol (byproduct of biodiesel production) as a source for fuels and chemicals. *The Open Fuels & Energy Science Journal*, 3, 17-21.
- Gaurava, N., Sivasankarib, S., Kiranc, G., Ninawea, A., & Selvinb, J. (2017). Utilization of bioresources for sustainable biofuels: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*(73), 205–214.
- Green, E. (2011). Fermentative production of butanol -the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 1-7.

- Haluska, A. (2010). *Increasing fermentative butanol production in clostridium beijerinckii using oxidized extracellular electron shuttling molecules*. Illinois: University of Illinois.
- Nakas, J., Schaedle, M., Parkinson, C., Coonley CE, C., & Tanenbaum, S. (1983). System-development for linked-fermentation production of solvents from algal biomass. *Applied and environmental microbiology*, 46(5), 1017-1023.
- Ølshøj Jensen, T., Kvist, T., Mikkelsen, M., Christensen, P., & Westermann, P. (2012). Fermentation of crude glycerol from biodiesel production by *Clostridium pasteurianum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39, 709–717.
- Sang-Hyun , L., Moon-Ho , E., Jin-Dal-Rae, C., Sooah , K., Jungyeon, K., Yong-An , S., & Kyoung Heon , K. (2016). Ex situ product recovery for enhanced butanol production by *Clostridium beijerinckii*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(5), 695-702.
- Santibáñez, C., Varnero, M., & Bustamante, M. (2011). Residual glycerol from biodiesel manufacturing, waste or potential source of bioenergy: a review. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(3), 469-475.
- Schuster, K., Goodacre, R., Gapes, J., & Young, M. (2001). Degeneration of solventogenic *Clostridium* strains monitored by Fourier transform infrared spectroscopy of bacterial cells. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 27, 314–321.
- Szymanowska-Powałowska, D. (2015). *Electronic Journal of Biotechnology. The effect of high concentrations of glycerol on the growth, metabolism and adaptation capacity of Clostridium butyricum DSP1*, 18, 128–133.
- Thaddeus , E., Nasib , Q., & Blaschek, H. (2007). Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, 1460-1469.
- Thompson, J., & He, B. (2006). Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied Engineering in Agriculture*, 22, 261-265.
- Whitman, W. (2009). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Georgia: Springer.
- www.genome.jp. (27 de febrero de 2017). Obtenido de KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.
- Yup Lee, S., Hwan Park, J., Hee Jang, S., Nielsen, L., Kim, J., & Jung, K. (2008). Fermentative Butanol Production by *Clostridia*. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(2), 209-228.
- Ziyong , L., Fuli , L., Cuiqing , M., & Ping, X. (2010). Butanol production by *Clostridium beijerinckii* ATCC 55025 from wheat bran. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(5), 495–501.

ANEXOS

Formulación del medio de cultivo

MEDIO DE CULTIVO DE CRECIMIENTO

- Peptona de caseína..... 1g.
- Extracto de levadura..... 2 g.
- MgSO₄..... 1g.
- Tioglicolato..... 0.5g.
- Agua Destilada..... cbp 1 L.
- Agar..... 15 g.

Ajustar el pH a 7 con NaOH

MEDIO DE CULTIVO MODIFICADO

- Peptona de caseína..... 0.5 g.
- Extracto de levadura..... 1g.
- MgSO₄..... 1 g.
- Tioglicolato..... 0.5 g.
- Agua Destilada..... cbp 1L
- Agar..... 15 g.
- Glicerol..... 14.2 mL

Ajustar el pH a 7 con NaOH

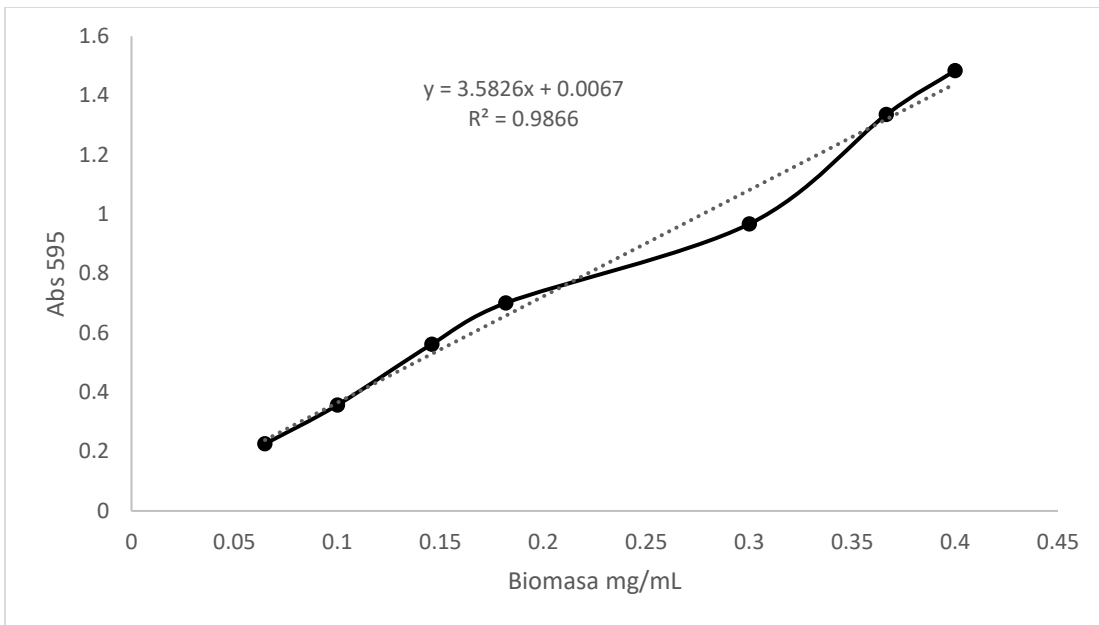
MEDIO DE PRODUCCIÓN

- K₂HPO₄ 0.75 g.
- KH₂PO₄ 0.75 g.
- MgSO₄ 7H₂O 0.70 g.
- MnSO₄ 5 H₂O 0.017 g
- FeSO₄ 7H₂O 0.01 g.
- (NH₄)₂SO₄..... 2 g.
- NaCl 1 g.
- Extracto de levadura 1 g.
- Glicerol..... 10% p/v

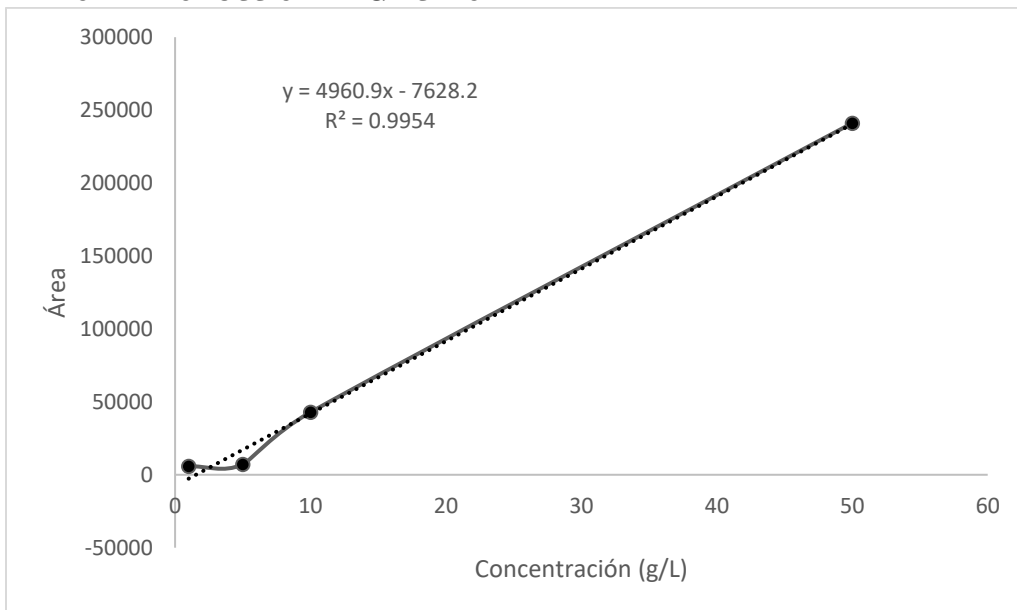
- Agua Destilada..... cbp 1 Litro

Curvas tipo

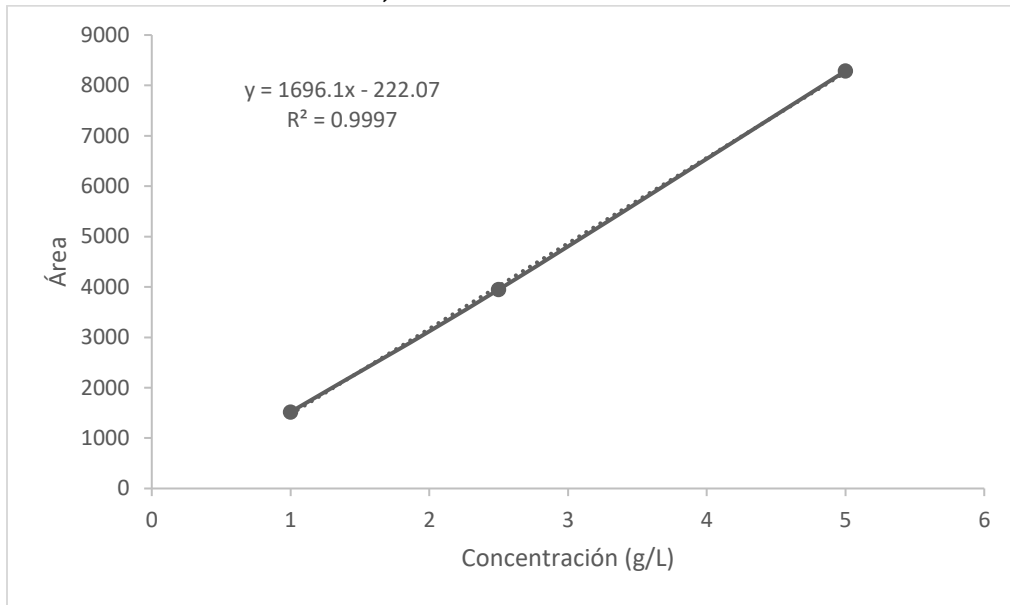
CURVA TIPO DE CRECIMIENTO



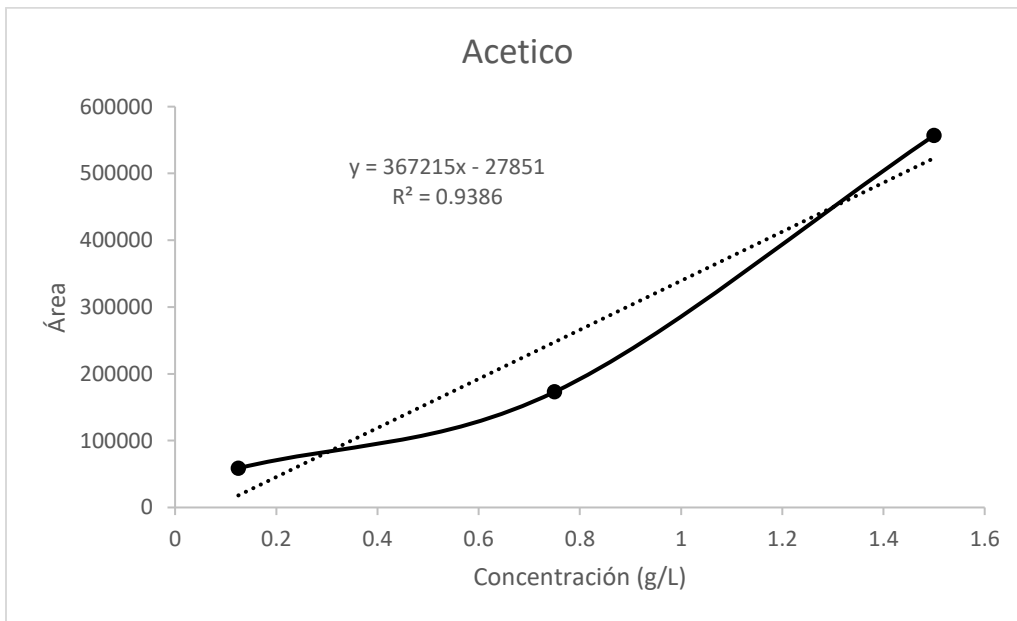
CURVA TIPO DE PRODUCCIÓN DE GLICEROL



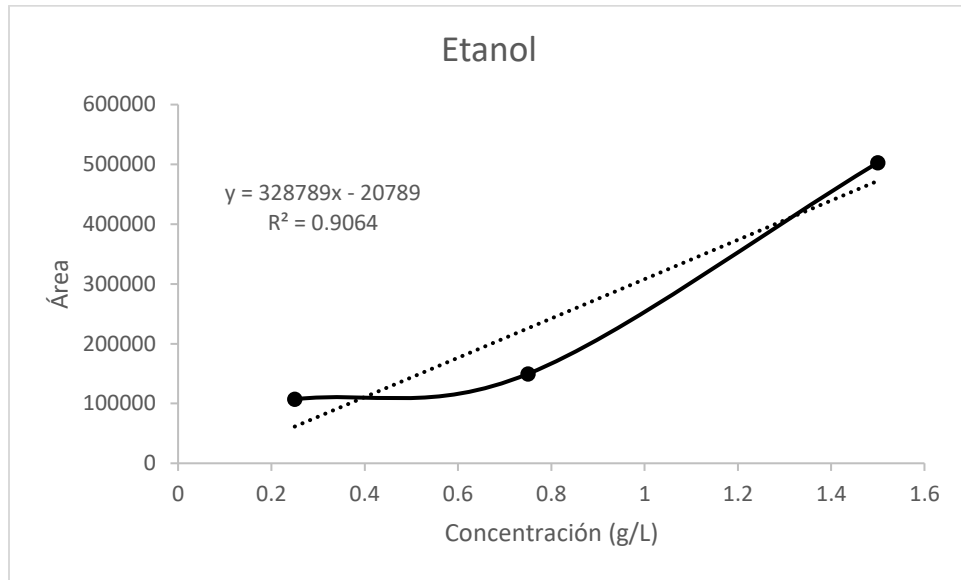
CURVA TIPO DE PRODUCCIÓN DE 1,3-PROPANODIOL



CURVA TIPO DE PRODUCCIÓN DE ACETATO



CURVA TIPO DE PRODUCCIÓN DE ETANOL



CURVA TIPO DE PRODUCCIÓN DE BUTANOL

