



SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



SEP

INFORME TÉCNICO

DE RESIDENCIA PROFESIONAL

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA

Iván Alberto Mandujano Ramos

NOMBRE DEL PROYECTO

**Evaluación de la presencia de *Zymomonas mobilis* durante el
proceso de fermentación de la taberna**

PERIODO DE REALIZACIÓN

AGOSTO-DICIEMBRE 2012

Contenido

LISTA DE TABLAS.....	3
INTRODUCCIÓN	4
JUSTIFICACION	6
CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA	7
Políticas y normas	7
Objetivos de la institución	7
Servicios que presta la institución.....	7
Descripción del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica.....	9
Funciones del departamento de Ingeniería Química y Bioquímica.....	9
PROBLEMAS A RESOLVER.....	11
OBJETIVOS	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos.....	12
Alcances y limitaciones	13
FUNDAMENTO TEÓRICO	14
METODOLOGÍA.....	16
1. Muestras de taberna.....	16
2 Aislamiento de Zymomonas mobilis a partir de de taberna	16
2.1 Re-aislamiento de las bacterias productoras de gas.....	16
3 Pruebas bioquímicas	17
4 Fermentación de carbohidratos.....	17
5 Medio para mantener la bacteria Zymomonas mobilis	17
6 Preparación de le muestras para extracción de ADN	18
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	19
PRUEBAS BIOQUIMICAS.....	21
EXTRACCION DE ADN	22
CONCLUSIONES	23
TRABAJOS CITADOS.....	24

LISTA DE TABLAS

Tabla No. 1 Microorganismos productores de gas.....	19
Tabla 2. Acidificación de medio WL.....	20
Tabla 3. Resultado de pruebas bioquímicas.....	21
Tabla 4.Fermentación de azúcares.....	21

INTRODUCCIÓN

La variedad de bebidas alcohólicas que se producen en comunidades rurales es muy amplia, en algunos casos estas bebidas se remontan a cientos de años, son parte de una tradición, de las costumbres de comunidades y pueblos.

En el sureste de México se encuentra *Acrocomia aculeata*, que en Chiapas se conoce con el nombre de coyol palabra de origen náhuatl, derivado de coyolli, que significa cascabel (Martinez, 1976), es una palma de abundantes espinas, su importancia radica en la diversidad de usos de que es objeto por parte de la población regional, se aprovechan flores, frutos, yemas y tallo; este último es utilizado para la fabricación de la taberna (Cruz, 2009), que es una bebida alcohólica fermentada de exquisito sabor, que es producida y consumida principalmente en la regiones rurales del estado de Chiapas, donde su consumo está ampliamente difundido. Posee un ecosistema muy amplio de microorganismos, algunas bacterias son ácido acéticas y otras bacterias son ácido lácticas, entre las cuales se encuentra *Zymomonas mobilis*.

Zymomonas mobilis es una bacteria gram negativa (Cazetta, 2007), no formadora de esporas y móvil, es un organismo productor de etanol. *Z mobilis* tiene algunas características que le dan una ventaja sobre otros organismos tales como levaduras, debido a que metaboliza más rápidamente la glucosa para generar etanol y tiene un mayor rendimiento en mayores cantidades, además de su alta tolerancia al etanol (Gunasekaran, 1986), lo cual es una cualidad altamente deseable.

La clasificación taxonómica es (Lindner, 1936):

Reino: *Eubacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

Clase: *Alfa Proteobacteria*

Orden: *Sphingomonadales*

Familia: *Zymomonas*

Género: *Zymomonas mobilis*

JUSTIFICACION

El proceso de fermentación de la taberna, hace de esta bebida tradicional un ecosistema interesante desde el punto de vista microbiológico y por su potencial biotecnológico. Para entender la función de los microorganismos en el proceso de la fermentación de la taberna es necesario profundizar en el estudio de toda la diversidad microbiana que está presente en esta bebida, para lo cual se necesitan llevar a cabo estudios para identificar los organismos presentes, tales como aquellos que son productores de etanol, debido a que es una característica representativa de esta bebida y en estudios posteriores analizar el potencial de estos microorganismos para su aplicación biotecnológica.

Con esta investigación se apoyará a otras investigaciones que se llevan a cabo acerca de esta bebida, para regenerar mayor información y en un futuro poder entender la manera en la que toda la diversidad biológica presente coexisten y trabajan de manera sinérgica para producir una bebida con características tan interesantes.

CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA

Este proyecto de residencia profesional fue realizado en el laboratorio de Investigación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, el cual se encuentra ubicado en la carretera Panamericana Km.1080.

Políticas y normas

Ser una oferta educativa tecnológica suficiente a nivel superior y postgrado, en las modalidades escolarizadas y abiertas, con perfiles profesionales acorde a los retos de todas las regiones del país.

Compartir con la población en general los beneficios de conocimiento, la cultura científica y tecnológica; en particular, proporcionar al público, con la finalidad de coadyuvar al modelo de desarrollo que el país reclama, para alcanzar el bienestar social que demandamos los mexicanos.

Objetivos de la institución

Promover el desarrollo integral y armónico del educando con los demás, consigo mismo y con su entorno, mediante una formación intelectual que lo capacite en el manejo de los métodos y los lenguajes sustentados, en los principios de identidad nacional, justicia, democracia, cultura, que le permiten una mente y cuerpo sanos.

Servicios que presta la institución

- Atender la demanda de educación superior y postgrado con alta calidad nacional e internacional en las áreas industriales, agropecuarias y de servicios,

en todas las regiones del país, como la forma de auspiciar el desarrollo regional. Se imparten 8 carreras a nivel Licenciatura, las cuales son: Ingeniería Bioquímica, Ingeniería Eléctrica, Ingeniería Electrónica, Ingeniería Industrial, Ingeniería Mecánica, Ingeniería Química, Ingeniería en Gestión Empresarial e Ingeniería en Sistemas Computacionales. Además se oferta el posgrado con la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica y la Maestría en Ciencias en Ingeniería en Mecatrónica.

- Hacer de cada uno de los institutos Tecnológicos un instrumento de desarrollo mediante una estrecha y permanente retroalimentación con la comunidad, en especial entre los sectores productivos de bienes y servicios, sociales, públicos y privados.
- Promover y convocar a los sectores productivos y educativos de cada localidad para generar y otorgar apoyos materiales y financieros adicionales, requeridos en la operación de los planteles.
- Compartir con la comunidad la cultura científica tecnológica y humanista, así como la recreación y el deporte, mediante los diversos foros y medios con que se cuenta el sistema.
- Oferta de perfiles profesionales que integran las necesidades específicas regionales, para que el egresado contribuya de manera satisfactoria al desarrollo de cada comunidad, en especial a la planta educativa.

- Actualizar de manera permanente al personal docente y administrativo, para favorecer el desarrollo armónico entre toda la comunidad tecnológica.

Descripción del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica

Este departamento se encarga de planear, coordinar, controlar y evaluar las actividades de docencia, investigación y vinculación en las áreas correspondientes a la Ingeniería Química y Bioquímica que se imparte en el Instituto Tecnológico, de conformidad con las normas y lineamientos establecidos por la Secretaría de Educación Pública, además de elaborar el programa educativo anual y el anteproyecto de presupuesto del departamento y presentarlo a las Subdirección Académica para lo conducente.

También se encarga de aplicar la estructura orgánica autorizada para el departamento de procedimientos establecidos.

Funciones del departamento de Ingeniería Química y Bioquímica

Las funciones del departamento son múltiples por lo que tiene que coordinarse con otros departamentos:

- ✓ Coordinar con las divisiones de estudios profesionales y postgrado e investigación, la aplicación de programas de estudios y con el departamento de desarrollo académico, los materiales y apoyos didácticos a las asignaturas de las correspondientes a las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se imparten en Instituto Tecnológico y controlar el desarrollo.

- ✓ Coordinar con la división de estudios profesionales y postgrado e investigación, con el departamento de desarrollo académico, la formulación y aplicación de técnicas e instrumento para la evaluación del aprendizaje de las asignaturas correspondientes en las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se imparte en el Instituto Tecnológico.
- ✓ Coordinar los proyectos de investigación educativa, científica y tecnológica en las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica que se llevan a cabo en el Instituto Tecnológico con el sector productivo de bienes y servicios de la región, así como controlar su desarrollo.
- ✓ Proponer a la Subdirección Académica el desarrollo de recurso y eventos que propicie la superación y actualización profesional del personal docente de las áreas de Ingeniería Química y Bioquímica, en el Instituto Tecnológico.
- ✓ Apoyar a la División de Estudios Profesionales en el proceso de titulación de los alumnos del Instituto.
- ✓ Superar y evaluar el funcionamiento del departamento con las demás áreas y con base a los resultados, proponer las medidas que mejoren su operación.
- ✓ Coordinar las actividades del departamento con las demás áreas de la Subdirección Académica.

- ✓ Presentar reportes periódicos de las actividades desarrolladas a la Subdirección Académica.

En el área de Ingeniería Bioquímica se cuenta con laboratorios, los cuales son utilizados para realizar las actividades experimentales correspondientes a las distintas materias impartidas en la institución, así como para la realización de proyectos de investigación que se llevan a cabo dentro del área.

El presente proyecto de residencia profesional fue realizado en los laboratorios de Biotecnología e Investigación ya que cuentan con los servicios y materiales necesarios para la realización de dicho trabajo.

PROBLEMAS A RESOLVER

La evaluación de la presencia de *Zymomonas mobilis* en muestras de taberna que fueron tomadas en diferente momentos del proceso de fermentación, usando pruebas bioquímicas, las cuales solo nos confirman la presencia pero no la población que se encuentra en cada momento.

Extracción de DNA y realización de PCR (Polymerase Chain Reaction) para confirmar por biología molecular que se trata de *Z. mobilis*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la presencia de *Zymomonas mobilis* durante el proceso de fermentación de la taberna.

Objetivos específicos

Aislamiento de *Zymomonas mobilis* a partir de taberna.

Realización de pruebas bioquímicas.

Evaluar la fermentación de carbohidratos.

Extracción de DNA de las cepas que coincidan con los criterios de *Z mobilis*.

Realización de PCR (Polymerase Chain Reaction)

Alcances y limitaciones

Alcances:

Con el desarrollo del proyecto se logro confirmar la presencia de *Z mobilis* debido a las condiciones en las que se aisló y a través de las pruebas bioquímicas.

Limitaciones:

Algunas limitantes que se presentaron durante el desarrollo de esta investigación fueron la disponibilidad de muestras recientes de taberna, ya que las muestras que se usaron han estado refrigeradas por más de 12 meses.

Entre las limitantes que se tuvieron para desarrollar el proyecto se puede mencionar el rezago en la entrega de oligonucleótidos, para la realización de la PCR(Polymerase Chain Reaction), por lo que se realizará como parte de las siguiente etapa de este proyecto

FUNDAMENTO TEÓRICO

La bacteria *Zymomonas mobilis*, es un microorganismo en forma de vaina de 1.0-2.0 x 4.0- 5.0µm, con extremos redondeados (Swings & De ley, 1977), Gram-negativa, anaerobia facultativa (Esparza, 2012). Es una de las pocas bacterias que degradan glucosa por la vía de Entner-Doudoroff (vía homoetanólica para la producción de etanol) (Esparza, 2012); No forma esporas, no tiene cápsula, lípidos intracelulares o glucógeno, es móvil, se le encuentra en, su crecimiento es viscoso, blanco cremoso, lento y limitado en medio sólido (Swings & De ley, 1977). Es poseedora de una fisiología única que le permite tener un alto rendimiento ($Y_{EtOH/Glucosa} = 0.51$) y productividad de etanol (1.6 g/Lh de etanol, a partir de 120g/L de glucosa) (Swings & De ley, 1977)). El 50% de las célula comprende el total de proteínas que contiene. Tolera temperaturas de hasta 40°C y 127 g/L de etanol (Lee, 1980), 300 g/L de glucosa y hasta 400 g/L de glucosa (Swings & De ley, 1977) (en comparación con *Saccharomyces cerevisiae*) (Sahm, 2006).

Durante la fermentación presenta crecimiento desacoplado, esto quiere decir, que puede seguir produciendo etanol en ausencia de crecimiento (Dimarco & Romano, 1985). Otra de las características importantes es el contenido de hopanoides en su membrana celular, como hopeno, hopanol y 1,2,3,4-tetrahidroxipentano-29-hopano (THBH, del que se encontró un valor mayor durante la fase estacionaria debido al incremento en la producción de etanol) (Dimarco & Romano, 1985); estos participan activamente en mantener la estabilidad y viscosidad de la membrana protegiendo a la célula ya que la acumulación de etanol en el medio de

cultivo provocaría inestabilidad en la membrana debido a que el etanol disuelve los lípidos de ésta haciéndola más permeable por lo que habría mayor salida de los fluidos de su interior. Pero no sólo la acumulación de etanol estimula la producción de hopanoides sino, también se encontró que un incremento en la temperatura de 14 a 37°C hace que aumente considerablemente la cantidad de estos en la célula (Schmidt y col., 1986). Otra característica importante de *Zymomonas mobilis* es que no tiene capacidad para llevar a cabo la fosforilación oxidativa (Dimarco & Romano, 1985)

METODOLOGÍA

1. Muestras de taberna.

1.1 Obtención de las muestras de taberna

Las muestras fueron proporcionadas por el laboratorio de Investigación del Departamento de Estudios de Posgrado del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez,

Las muestras estuvieron conservadas en glicerol a un % por un periodo aproximado de 10 meses.

2 Aislamiento de *Zymomonas mobilis* a partir de de taberna

Para determinar la presencia de la bacteria *Zymomonas mobilis* en la taberna se empleará un medio de cultivo selectivo con una composición de extracto de malta 0.3%, extracto de levadura 0.3%, glucosa 2.0%, peptona 0.5% y cicloheximida 0.002%, en tubos de ensaye con 9 ml de medio con un tubo Durham invertido, se inoculará con 1 ml de taberna, la incubación será a una temperatura de 30 °C durante 24 horas (Obire, 2005).

La producción de gas indicará la presencia de la bacteria *Zymomonas mobilis*.

2.1 Re-aislamiento de las bacterias productoras de gas

El re-aislamiento ser realizado en placas de agar WL, e incubado a una temperatura de 30°C durante 48 horas, para la purificación de la cepa se realizará

transferencia por estriado en medio de cultivo descrito por (Bandaru, 2005) (glucosa 100 g/L, extracto de levadura, 10 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, (NH₄)₂ SO₄ MgSO₄) que además incluirá 3 % de etanol y 0.002% de cicloheximida.

3 Pruebas bioquímicas

A las cepas aisladas se les realizará una caracterización fenotípica, las pruebas a realizar será: tinción de Gram, catalasa, movilidad, reducción de nitratos, oxidasa, ureasa (Manual Básico de Microbiología , 2009) (Obire, 2005).

4 Fermentación de carbohidratos

Se determinará la habilidad del microorganismo de fermentar diferentes azúcares como son: glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, y maltosa, utilizando medio de cultivo compuesto de el azúcar a determinar 1%, extracto de levadura 0.5%, aun pH 6.8 (Obire, 2005).

5 Medio para mantener la bacteria *Zymomonas mobilis*

La bacteria *Zymomonas* previamente aislada de la taberna de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*), será crecida en medio descrita por (Bandaru, 2005) (glucosa 100 g/L, extracto de levadura, 10 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, (NH₄)₂ SO₄ MgSO₄ y pH de 5.5) e incubada anaeróticamente a 30°C con agitación a 100 rpm (Thanokeo, 2011). Los cultivos serán mantenidos en un medio solidificado con 2% de agar a 4°C (Thanokeo, 2011).

6 Preparación de le muestras para extracción de ADN

De las muestras que tienen un resultado positivo, se crecerán en el medio propuesto por Bandera (2005) a 30°C por 72 h para asegurar la presencia de biomasa.

La extracción se realizará de acuerdo al manual de instrucciones del kit que se usará, Zymo Research Fungal/Bacterial DNA Miniprep (tm) Catalog No. D6005

RESULTADOS Y DISCUSIONES

2 Aislamiento de *Zymomonas mobilis* a partir de de la taberna

Catorce muestras de taberna fueron proporcionadas por el laboratorio de Investigación, que representan los 14 tiempos de muestreo que se realizaron, se inocularon en el medio propuesto por Obire en 2005, en el cual, la producción de gas es considerado un resultado positivo y es una característica de *Z mobilis*.

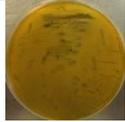
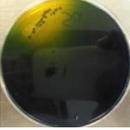
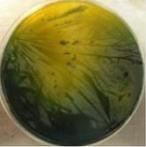
Tabla No. 1 Microorganismos productores de gas.

Fecha	Tiempo	Producción de gas	
		A	B
22-03	1	No	No
23-03	2	No	No
24-03	3	Si	No
25-03	4	Si	Si
26-03	5	Si	Si
27-03	6	Si	Si
28-03	7	No	No
29-03	8	Si	Si
30-03	9	Si	Si
31-03	10	No	No
01-04	11	Si	Si
02-04	12	No	No
03-04	13	No	No
04-04	14	No	No

2.1 Re-aislamiento de las bacterias productoras de gas

El re-aislamiento se realizo en medio WL (Manual Básico de Microbiología , 2009), que contiene verde de bromocresol, que sirve como indicador cuando hay un cambio de pH en el medio, por lo que se infiere que un microorganismo acidifica el medio si hay un viraje de color de azul a amarillo, esto es concordante con lo publicado por Obire, 2005, ya que el afirma que durante el crecimiento de *Z mobilis*, el pH decrece.

Tabla 2. Acidificación de medio WL.

Aislado	Viraje de color	Imagen
Control	No	
3a	Si	
4b	Si	
5a	Si	
6a	Si	
8b	Si	
9a	Si	
11a	Si	

PRUEBAS BIOQUIMICAS

Tabla 3. Resultado de pruebas bioquímicas.

Aislado	Gram	Oxidasa	Catalasa	Manitol	Ureasa	Movilidad	Reduc. nitratos
3a	-	+	+	+	-	+	-
4b	-	+	+	+	-	+	-
5a	-	+	+	+	-	+	-
6a	-	+	+	+	-	+	-
8b	-	+	+	+	-	+	-
9a	-	+	+	+-	+	+	-
11b	-	+	+	+	-	+	-

las cepas que fueron analizadas presentan resultados concordantes con lo reportado acerca de *Zymomonas mobilis* debido a que en las pruebas se observa que son bacilos gram negativo, al igual que catalasa positiva y negativa en reducción de nitratos al igual que lo reportado por Bayona en 2002, es motil, y negativo para oxidasa y ureasa concordante con Obire en 2005, y como lo reportado en el 2012 por Esparza, presenta formación de manitol.

Tabla 4. Fermentación de azúcares.

Aislado	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Lactosa	Maltosa
3a	+	+-	+	-	-
4b	+	+	+	-	-
5a	+	+	+	+-	+-
6a	+	+-	+-	-	-
8b	+	+	+-	-	-
9a	+	+-	+-	-	-
11b	+	+-	+-	-	-

Z mobilis tiene un limitada variedad de fuentes de carbono que puede metabolizar, glucosa, fructosa y sacarosa (Esparza, 2012) y está reportado que no fermenta lactosa (Bayona, 2002) ni maltosa (Obire, 2005).

En seis de las siete cepas analizadas los datos reportados, son congruentes con los obtenidos durante la realización de este experimento. Un aislado presenta

resultados distintos por lo que es necesario llevar a cabo la siguiente etapa de análisis PCR, secuenciación y análisis de la secuencia obtenida.

EXTRACCION DE ADN.

La extracción fué realizada siguiendo las especificaciones del proveedor, las muestras han sido refrigeradas a -5°C.

CONCLUSIONES

Los resultados de las pruebas muestran que 6 de las 7 muestras analizadas (excepto las 5a) poseen las características propias de *Zymomonas mobilis*, ya que fueron tolerantes a una concentración de 3% de alcohol etílico, son resistentes a la cicloheximida, y presentaron resultados similares a los reportados por otros equipos.

La siguiente etapa de esta investigación es comprobar los resultados ya obtenido, por medio de biología molecular, realizar el PCR(Polymerase Chain Reaction) a todas las muestras y comprobar de esta manera que sí se trata de *Zymomonas mobilis*.

TRABAJOS CITADOS

- Bandaru, V. (2005). Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch by co-immobilized amyloglucosidase and cells of *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology* .
- Bayona, M. (2002). Determinin contaminating bacteria in the ethyl alcohol production process and their relationship to *Saccaromyces cervisiae* flocculation. *Revista Colombiana de Biotecnoloia* , 64-71.
- Cazetta, M. (2007). Fermetation of molasses by *Zymomonasmobilis*: effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Science Direct* , 2824-2828.
- Cruz, R. (2009, octubre). Evaluacion de los polifenoles de la palma de coyol(*Acrocomia aculeata*) sobre agentes causale de enfermedades. 3. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico.
- Dimarco, A., & Romano, H. (1985). D-glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* , 151-157.
- Esparza, E. (2012). *Produccion de etanol por Zymomonas mobilisen fermentación en medio sólido*. Universidad Autonoma Metropolitana, Mexico D. F.
- Gunasekaran, P. (1986). Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* strains on different sustrates- a comparative study. *J. Biosci* , 181-186.
- Manual Básico de Microbiología* . (2009). Panreac.
- Martinez, M. (1976). *Catálogo de nombres vulgares y cientfico de plantas mexicanas*. Mexico, D. F.: Fondo de cultura económica.
- Obire, O. (2005). Activity of *Zymomonas speciaes* in pal-sap obtained from therr areas in Edo State, NigeriaJO. *Journal of Applied Sciences and Evironmental Management* , 25-30.
- Sahm, H. (2006). In M. Dworkin, & S. Falkow, *The Prokaryotes* (pp. 201-221). Standfor, California, United States of America: Springer.
- Swings, J., & De ley, J. (1977). The Biology of *Zymomonas*. *American Society for Microbiology* , 1-46.
- Thanokeo, P. (2011). Ethanol production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) by *Zymomonas mobilis* TISTR548. *African Journal of Biotechnology* , 10691-10697.