

Glicerol crudo utilizado como sustrato para la producción de un pigmento de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R

Francisco Javier Bacame Valenzuela^{1,2}, Jesús Alberto Pérez García¹, María Yolanda Reyes Vidal^{1,2}

¹ Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica. Parque Tecnológico Querétaro s/n Sanfandila, Pedro Escobedo, Querétaro, C.P. 76703.

² CONACYT - Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, Parque Tecnológico Querétaro s/n Sanfandila, Pedro Escobedo, Querétaro, México. C.P. 76703. fbacame@cideteq.mx

Resumen

Debido al aumento en la demanda de los combustibles fósiles, se han incrementado los efectos negativos en el medio ambiente. Por ello, los biocombustibles, como el biodiesel, son una alternativa menos tóxica para el ambiente. Sin embargo, durante el proceso de producción del biodiesel, también se genera un subproducto principal que consiste en glicerol crudo, donde se obtiene aproximadamente un 10 % del total del peso del producto. Una aplicación de este efluente industrial es su uso como medio de cultivo para la producción de compuestos de valor agregado. En este trabajo se logró obtener piocianina (PYO), producida por *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R, que presenta diversas actividades biológicas, en especial su capacidad antimicrobiana. Se utilizó glicerol crudo al 1 % v/v como medio de cultivo y se comparó su comportamiento con glicerol puro, tomando al medio Luria Bertani (LB) como control positivo. Los resultados obtenidos indicaron que la producción de biomasa fue similar al control en el medio de cultivo con glicerol crudo. Se obtuvo 30 % más de PYO comparado con el control positivo. Mediante cromatografía de líquidos de ultra resolución (UPLC), mediante el uso de detectores arreglo de fotodiodos (PDA) y detector de masas (QDa), se encontró que el tiempo de retención y los espectros de absorción son similares entre piocianina estándar y piocianina producida en este sistema. En QDa se obtiene el mismo patrón de masas para la molécula estándar y la producida. Así, quedó demostrado que el glicerol crudo puede ser utilizado para la producción de compuestos de valor agregado utilizando la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R, con una posible reducción de costos en el proceso debido al uso de residuos en vez de medio de cultivo comerciales.

Palabras clave: Glicerol crudo, *Pseudomonas aeruginosa*, piocianina, biodiesel

Abstract

*The increase in the demand of fossil fuels has risen the negative effects on the environment. Therefore, biofuels are a less toxic alternative to the environment, such is the case of biodiesel. However, it also generates a main by-product, which consists of crude glycerol, obtaining approximately 10% of the total weight of the product. An application to this industrial effluent is its use as a growth medium for the production of value-added compounds. In this work, it was possible to produce pyocyanin (PYO) of *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R, which among its diverse biological activities stands out its antimicrobial capacity. 1 % crude glycerol was used as growth medium and its behavior was compared with pure glycerol, LB medium was also taken as a positive control. As results, it was obtained that the production of biomass was similar to the control in the culture medium with crude glycerol. The production of PYO was able to produce 30 % more compared to the positive control. By means of UPLC coupled to PDA and QDa detectors it was found that the retention time and the absorption spectra are similar in the pyocyanin standar and pyocyanin produced in the system. In QDa you get the same mass pattern for the standard molecule and molecule produced. Thus, it was demonstrated that crude glycerol can be used for the production of value-added compounds using the *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R strain, with a possible reduction of costs in the process due to the use of waste instead of commercial culture medium.*

Keywords: Crude glycerol, *Pseudomonas aeruginosa*, pyocyanin, biodiesel

Artículo arbitrado

Recibido:
22 de abril de 2019

aceptado:
19 de julio de 2019

Introducción

En las últimas décadas, la demanda de combustibles se ha incrementado debido al drástico aumento en la población (Hassan et al., 2017). Actualmente, los combustibles derivados del petróleo permiten un rápido y eficiente sistema de transporte de personas, así como de la industrialización. Estos combustibles tienen como desventaja las bajas reservas disponibles y las excesivas emisiones de gases invernadero (Saini et al., 2017). En la década de 1970, inició una fuerte preocupación, debido a la crisis de combustibles. Una serie de esfuerzos académicos y gubernamentales fueron enfocados para resolverlo (Hassan et al., 2017). Por ello, la búsqueda de fuentes renovables y amigables para el medio ambiente, que contribuyan con la obtención de energía, es de gran interés entre la comunidad científica.

Una solución a esta problemática es la obtención de biocombustibles a partir de fuentes renovables. Los biocombustibles han resultado ser una excelente opción que contribuye al desarrollo de una industria química sostenible (González et al., 2017). Uno de los biocombustibles de mayor uso en la actualidad es el biodiesel, el cual representa una excelente opción para contrarrestar los graves efectos negativos de la utilización de los combustibles fósiles. Además, el biodiesel puede ser obtenido a partir de fuentes renovables. Este biocombustible puede ser utilizado en forma pura o en mezclas con el diésel regular, esta forma es la más común (Franca et al., 2017). El biodiesel es una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos provenientes de aceites vegetales, grasas animales y algas (Marx et al., 2016). La síntesis del biodiesel se lleva a cabo mediante la reacción de transesterificación entre los ésteres de ácidos grasos y el alcohol, donde se utiliza como catalizador una base fuerte. Esta reacción se lleva a cabo en 3 etapas consecutivas, donde los triglicéridos son convertidos a diglicéridos y estos a monoglicéridos. De ese modo, el biodiesel es el producto final de interés; sin embargo, se obtienen

subproductos como el glicerol crudo, cubiertas de semillas, vainas, cáscaras, pastas desecadas, agua de lavado, entre otros (Tacias et al., 2016). El glicerol crudo es el subproducto más importante, la razón es porque se produce en mayor proporción, del cual aproximadamente contiene entre 50 a 60 % v/v de glicerol crudo, 12 a 16 % v/v de álcalis, 15 a 18 % v/v de ésteres metílicos, 8 a 12 % de metanol y 2 a 3 % v/v de agua, también puede contener elementos como Ca, Mg, P o S (Maru et al., 2016).

Otras fuentes de glicerol crudo son la industria del jabón, algunos procesos de fermentación microbiana, la hidrogenólisis de glucosa en mezcla de polioles, la producción de ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos. En el proceso de biodiesel se generan 1 mol de glicerol crudo por cada 3 moles de ésteres de ácidos grasos, los cuales equivalen al 10 % del peso del total del producto.

El glicerol crudo se clasifica en dos categorías según su pureza: glicerol crudo con pureza que oscila entre 60 a 80 % y glicerol refinado con pureza de 99.1 a 99.8 % (Lee et al., 2015), que delimita sus aplicaciones y los procesos para su purificación. Algunos de estos permiten refinar el glicerol crudo hasta grados de pureza del 95.5 al 99.0 % para su uso en la industria farmacéutica, alimenticia o cosmética, lo cual es viable sólo para los grandes productores de glicerol crudo. En cambio, los pequeños productores buscan alternativas para el uso del glicerol crudo sin un proceso que elimine las impurezas (Anitha et al., 2016).

Diversas investigaciones se centran en la utilización del glicerol crudo como sustrato para la obtención de productos de valor agregado, para evitar que sea desechado como agua residual. Lo anterior se debe a que se han producido grandes cantidades de biodiesel en las últimas décadas, con ello se genera una proporción similar de subproductos como el glicerol crudo. En el año 2013, tanto en Estados Unidos como en la Unión Europea, la producción de glicerol crudo fue de 1.8 billones de galones. Además, existen países como Brasil donde, por ley,

se exige que los combustibles tipo diesel contengan un 7 % de biodiesel (Bewley et al., 2015). Esto conlleva a la generación de una gran cantidad de subproductos. Por lo tanto, el glicerol crudo es uno de los obstáculos para la comercialización del biodiesel, ya que es un subproducto cuya generación no se puede evitar. Asimismo, la purificación del glicerol crudo es un proceso de alto precio y requiere de equipo costoso. Ante este panorama, es recomendable analizar nuevas oportunidades para el uso de tales subproductos por diversas rutas químicas, por ejemplo, para la obtención de productos de valor agregado, de modo que se mejore la bioeconomía y se reduzca el uso de los productos derivados del petróleo (Gonzalez et al., 2017).

Algunos procesos que utilizan glicerol crudo como sustrato son: la síntesis de químicos como el 1,3-propanodiol, ácido fórmico, ácido succínico y propanol, en la producción de aditivo para combustible, en la producción de hidrógeno, pirolisis y gasificación, en la fermentación en procesos biológicos, para la producción de metanol, en la aplicación en celdas de combustible, para la desnitrificación en plantas tratadoras de agua, entre otros (Anitha et al., 2016). También el uso del glicerol crudo como sustrato puede ser clasificado dependiendo del tipo de reacción mediante la cual es transformado, como el caso de la oxidación, deshidratación, acetilación, eterificación, esterificación, acetalización y proceso de amoxidación para obtener productos como ácido cítrico, ácido láctico, 1,3-dihidroxiacetona, 1,3-propanodiol, dicloro-2-propanol, acroleína, hidrógeno y etanol, entre otros (Bagheri et al., 2015). La transformación microbiana (mediante cepas nativas o cepas mutantes) es una de las alternativas para usar el glicerol, se aprovecha el metabolismo de las bacterias hasta la obtención de productos de valor agregado. Los principales productos obtenidos en la transformación del glicerol por vía microbiana son alcohol, hidrógeno y otros productos. Estos procesos de fermentación requieren una menor energía, comparados con otros procesos de conversión (He et

al., 2017). El medio de cultivo es lo más costoso en los cultivos microbianos, por lo que el uso de subproductos de procesos industriales disminuye el costo asociado.

Síntesis microbiana de 1,3-propanodiol

El 1,3-propanodiol es un monómero de gran importancia por sus diversas aplicaciones industriales, como la síntesis de un nuevo tipo de poliéster, la síntesis de polímeros, cosméticos, alimentos, lubricantes y medicamentos. El mercado del 1,3-propanodiol se encuentra en constante crecimiento. Tan sólo para el año 2009, la demanda fue de 60 kilotoneladas, con una proyección de incremento a 150 kilotoneladas para el 2019, lo cual elevó su valor de \$ 157 millones de dólares a \$ 560 millones de dólares. Existen varios microorganismos con capacidad de producir este compuesto como *Klebsiella pneumoneae*, *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus buchneri* (Hejna et al., 2016). A través del uso de células de *Klebsiella pneumoneae* cepa BLh-1 inmovilizadas en Ca-alginato, se reporta una producción de 1.84 g/L 1,3-propanodiol a las 12 horas. Por otro lado, mediante el uso de células en suspensión se obtuvieron solamente 1.22 g/L/h de 1,3-propanodiol a las 16 horas. Este estudio usó un medio de cultivo que contenía 65 g/L de glicerol crudo, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de peptona, 7 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7 g/L K_2HPO_4 , y 1 mL de solución de elementos traza (Aquino et al., 2014). Por otra parte, durante la producción de 1,3-propanodiol con *Citrobacter freundii* se reporta un rendimiento del 28 %, cuando se utiliza glicerol crudo como medio de cultivo, se obtienen, además, varios subproductos en conjunto como 12 % de ácido succínico y más del 50 % de ácido acético (Ferreira et al., 2012). Otro microorganismo reportado como productor de 1,3-propanodiol es la mutante LDH3 de *Klebsiella oxytoca* con rendimientos de 0.53 g/mol cuando se utilizan condiciones de cultivo en lote y 0.83 g/L/h

cuando se genera el producto en lote alimentado (Hejna et al., 2016).

Síntesis de biohidrógeno

La producción de biohidrógeno resulta la forma de energía más amigable con el medio ambiente. En este caso, la fermentación oscura es el sistema que se utiliza para la obtención de biohidrógeno. Uno de los microorganismos más eficiente para transformar los sustratos es *Clostridium pasteurianum*, el cual puede utilizar carbohidratos o glicerol como fuente de carbono, se tiene como principal diferencia la cantidad de metabolitos obtenidos. Cuando se utilizan carbohidratos, se obtienen butirato, acetato, lactato y etanol. Por el contrario, cuando se utiliza glicerol como fuente de carbono, se producen como principales metabolitos 1,3-propanodiol, butanol, butirato, acetato, lactato y etanol. Mediante el uso de *Clostridium pasteurianum* CH4 a una concentración de glicerol de 10 g/L, se obtuvieron 103.1 ± 8.1 mL/h/L de biohidrógeno utilizando al glicerol puro. En contraposición, cuando se utilizó glicerol crudo a la misma concentración, se obtuvo una producción de 166.0 ± 8.7 mL/h/L de biohidrógeno (Chung et al., 2013). Por otra parte, utilizando la cepa de *Escherichia coli* MG1655 y un medio de cultivo compuesto por glicerol crudo 10 g/L, Na₂SO₄ 0.0806 g/L, NaCl 0.0152 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.0310 g/L y peptona 4.25 g/L, se obtuvieron 8.5 ± 1.70 g/L de biohidrógeno (Cofré et al., 2016). De ese modo, queda demostrado el potencial del glicerol crudo para la producción de biohidrógeno.

Síntesis de enzimas

El glicerol crudo también puede ser utilizado como fuente de carbono para la producción de proteínas de interés industrial. Macedo et al. (2017) reportan que, a través del uso de un medio mínimo suplementado con glicerol crudo, es posible obtener la enzima recombinante de lipasa B de *Candida antártica* (rLipB) en *Pichia pastoris*. Los resultados obtenidos fueron comparados con aquellos producidos con la lipasa comercial de *Aspergillus niger* de Novozymes. Se consiguieron los mismos resultados para sus

valores óptimos de pH y temperatura, 7 y 30 °C, respectivamente. Este proceso es de gran relevancia para la industria del biodiesel, ya que, además de la catálisis química para la producción de este, también puede ser obtenido por catálisis enzimática usando lipasas. Por lo cual, si se considera a esta enzima en la producción del biodiesel, los costos del proceso podrían disminuir.

Al quedar demostrado que el glicerol crudo puede ser utilizado como fuente de carbono en medios de cultivo para la producción de compuestos de valor agregado, en este trabajo se plantea el uso del glicerol crudo como fuente de carbono para la producción de una piocianina (PYO) de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R. Este metabolito es de interés en tanto que ha sido demostrada su capacidad como antimicrobiano, además de su importancia por ser considerado un metabolito redox con aplicaciones en sistemas bioelectroquímicos, entre otras aplicaciones biológicas.

Métodos

Cepa

Se utilizó la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R del Laboratorio de Microbiología Ambiental del Centro de Investigación y Desarrollo en Electroquímica. La cepa fue conservada en agar LB (20 g/L de peptona, 10 g/L de extracto de levadura y 0.5 g/L de NaCl) a 4 °C.

Medio de cultivo

Todos los experimentos fueron a partir de cultivos frescos de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R. Se utilizó caldo LB como control positivo para la producción de biomasa y PYO.

El medio de cultivo con glicerol crudo fue preparado con 1 % v/v de glicerol crudo, el pH fue ajustado a 10. Estos medios de cultivo fueron suplementados con 1 g/L de extracto de levadura. Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave Lab Tech modelo LAC 5040Sa 121 °C por 15 min. Posteriormente, los medios fueron inoculados con 1

mL de un inóculo de 24 horas en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

Determinación de biomasa

La biomasa de los diferentes cultivos fue determinada mediante el método del peso seco. Los cultivos fueron centrifugados a 7500 rpm en una centrifuga *epENDORF* modelo 5430 R, por 10 minutos. El sobrenadante fue separado, mediante la colocación de la pastilla celular y obtenido en charolas de aluminio previamente taradas. Las charolas fueron colocadas en un horno de secado Felisa modelo FE-292D, a 100 °C por una hora. Posteriormente, fueron enfriadas en un desecador y se determinó su peso final. La biomasa fue calculada por diferencia de peso en g/L.

Análisis de cromatografía de PYO

El análisis de cromatografía de PYO se llevó a cabo en un equipo UPLC Waters clase H Acquity, acoplado a una bomba cuaternaria, auto muestreador refrigerado y detector PDA (Waters, México), columna UPLC BEH C18 (50 mm x 2.1 mm d.i., 1.7 µm), la fase móvil fue un gradiente isocrático agua: acetonitrilo 90:10, flujo de 0.3 ml/min, se mantuvo la temperatura de la columna a 30 °C, volumen de inyección de 5 µL y absorbancia de 387 nm.

Para la identificación de PYO se utilizó un detector de masas, QDa modelo Acquity (Waters, México), el cual fue operado en modo *electrospray* de ión positivo, el voltaje del cono se ajustó a 10 V. La temperatura de desolvatación fue de 600 °C. El modo MS Scan se usó para obtener el espectro de masas completo con relaciones de m/z entre 100 y 600, adquiridos con frecuencia de muestreo de 5 puntos/s y se posiciona el análisis de masas en el ion $[M + H]^+ = 211$ m/z. Como compuesto estándar se utilizó piocianina (Sigma-Aldrich). Todas las muestras y estándares se filtraron con membrana de nylon de 0.2 µm marca Millipore. Los datos cromatográficos fueron obtenidos y procesados mediante el software Empower 3 (Waters, México).

Resultados

A continuación, mediante las figuras 1 al 6 se hace una presentación de los resultados obtenidos.

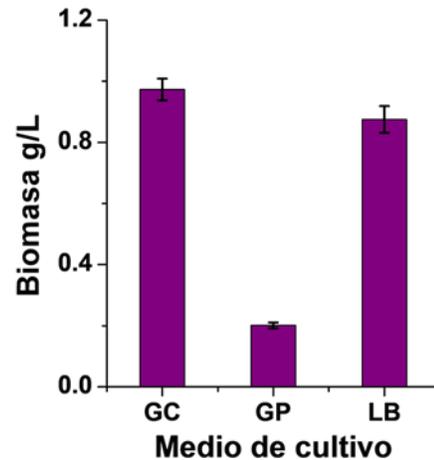


Figura 1. Producción de biomasa por *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R utilizando tres medios de cultivo: (GC) glicerol crudo; (GP) glicerol puro; (LB) medio Luria Bertani a las 48 horas de incubación. Fuente: elaboración propia.

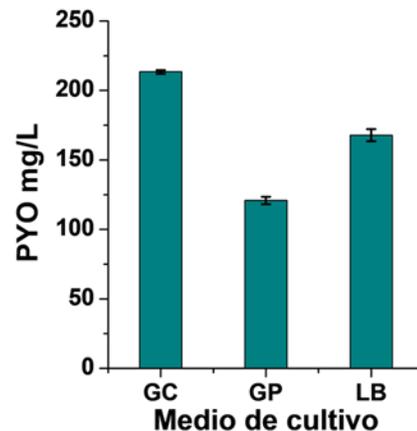


Figura 2. Producción de PYO por *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R utilizando tres medios de cultivo: (GC) glicerol crudo; (GP) glicerol puro; (LB) medio Luria Bertani a las 48 horas de incubación. Fuente: elaboración propia.



Figura 3. Sobrenadante del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R. (a) medio de cultivo Luria Bertani; (b) medio de cultivo con glicerol crudo. Fuente: elaboración propia.

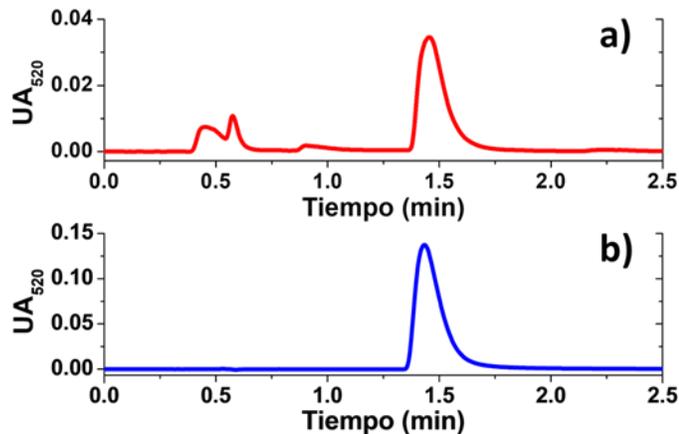


Figura 4. Cromatograma de PYO (a) sobrenadante de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R; (b) estándar de PYO. Fuente: elaboración propia.

Discusiones y conclusiones

Como se observa en la Figura 1 se obtuvo producción de biomasa en los tres tratamientos utilizados, se destaca el uso del glicerol crudo como fuente de carbono, ya que se logró una producción de biomasa de 0.97 ± 0.03 g/L, lo cual es superior en un 10 % a la biomasa obtenida con el control positivo 0.87 ± 0.02 g/L (medio LB). Este medio de cultivo es un medio general para bacterias y comercialmente disponible. Por su parte, la producción de biomasa en el medio de cultivo con glicerol puro fue de 0.18 g/L, siendo el 20 % de la biomasa producida por el control positivo (0.90 g/L). Esto sugiere que los componentes diferentes al glicerol, que están presentes en el medio de cultivo con glicerol crudo, son tomados como fuente de carbono por *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R.

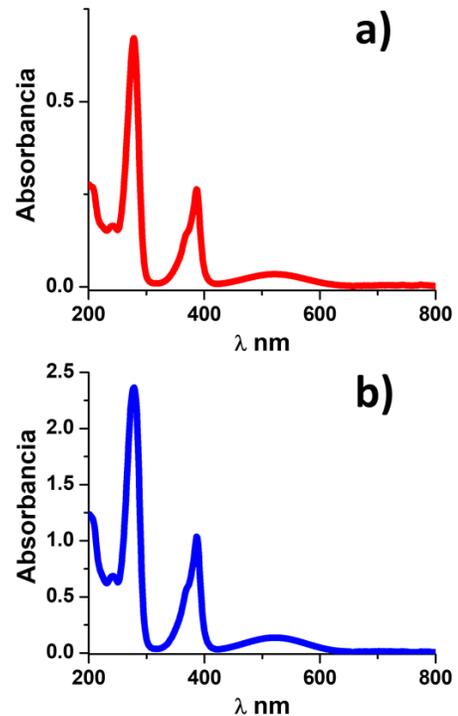


Figura 5. Espectro de absorción de PYO obtenido del sobrenadante de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R; (b) estándar de PYO. Fuente: elaboración propia.

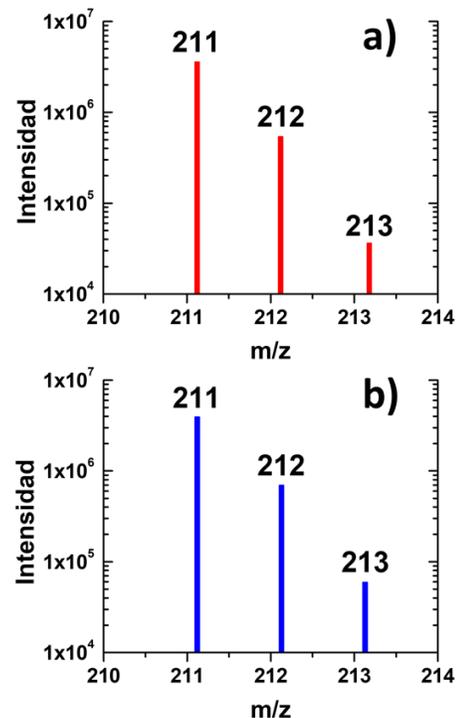


Figura 6. Patrón de masas de PYO obtenida en el sobrenadante de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R; (b) estándar de PYO. Fuente: elaboración propia.

Por otra parte, la producción de PYO en el medio de cultivo con glicerol puro fue de un $(120 \pm 2.61 \text{ mg/L})$ 70 % respecto al control LB $(167 \pm 4.26 \text{ mg/L})$, este resultado sugiere que gran parte del glicerol consumido por *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R fue utilizada para la síntesis de este metabolito secundario, ya que la producción de biomasa para este tratamiento fue baja $(0.201 \pm 0.009 \text{ g/L})$ al ser sólo de un 25 % de la biomasa obtenido con el medio LB. En el caso del tratamiento con glicerol crudo, se obtuvo 30 % $(213.42 \pm 1.30 \text{ mg/L})$ más de PYO que en el control positivo (LB), lo cual demuestra que los componentes del glicerol crudo, considerados como impurezas, no tienen un efecto negativo sobre la producción de PYO en *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R. Se reporta que dichas impurezas presentes en el glicerol crudo son metanol, álcalis, mono y diglicéridos, colorantes vegetales, agua y detergentes (Hájek et al., 2010; Miran et al., 2019; Yang et al., 2012).

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* son productoras de varios metabolitos secundarios pertenecientes al grupo de las fenazinas, entre ellos la PYO. Este metabolito se caracteriza por ser un pigmento de color azul (Figura 3), se diferencia del resto que presentan una coloración de tono amarillo. La mezcla de estos metabolitos pigmentados produce la coloración verde típica en los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R, usualmente se usan medios de cultivo de laboratorio como el medio LB (Figura 3a). En este trabajo, los medios de cultivo, que incluyeron glicerol crudo como componente, indujeron coloraciones azules en el caldo de fermentación, típicas de los metabolitos producidos por diversas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 3b). Este resultado sugiere que los componentes de este efluente industrial disminuyen o inhiben la producción de los metabolitos pigmentados de color amarillo. Esto podría ser de gran relevancia, ya que favorece la etapa de recuperación de PYO, durante los procesos de extracción y purificación del compuesto.

Por otra parte, el uso del glicerol crudo como fuente de carbono puede deberse a que las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* son conocidas por su versatilidad metabólica, ya que pueden degradar un amplio rango de compuestos orgánicos simples y complejos (Yong et al., 2017). De acuerdo con esto, la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R podría estar utilizando o tolerando las impurezas presentes en el glicerol crudo y asimilándolas como fuente de carbono, ya sea para producción de biomasa o de metabolitos secundarios.

Para comprobar que la molécula producida por *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R fue PYO, se utilizaron técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución acopladas a detectores de arreglo de diodos (PDA) y masas (QDa). Se obtuvo una señal con el detector PDA, con un tiempo de retención de 1.4 minutos para los tres medios de cultivo utilizados (Figura 4a), esta señal coincide con el estándar de PYO, como se muestra en la Figura 4b. Utilizando este mismo sistema cromatográfico, se obtuvo el espectro de absorción de PYO para el estándar del compuesto (Figura 5b), el cual resulta ser similar a la señal obtenida en el sobrenadante del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R (Figura 5a). Estos resultados indican que la molécula producida por dicho microorganismo es PYO. Para comprobar la presencia de esta molécula se realizó cromatografía de líquidos acoplada a un detector de masas. La Figura 6a corresponde al estándar de PYO obteniendo un valor máximo en la relación de masa/carga (m/z) de 211, el cual corresponde a PYO $[M + H]^+ = 211 \text{ m/z}$. También se observan dos picos a 212 y 213 relacionados con los iones isotópicos de PYO $[M + H]^+$. Estos resultados coinciden a los obtenidos para el sobrenadante del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R, cuando se utiliza glicerol crudo como medio de cultivo, lo cual corrobora la producción de PYO en dicho cultivo.

Con este trabajo se demuestra que el glicerol crudo, obtenido del proceso de producción de biodiesel, puede ser considerado para la elaboración de

compuestos de valor agregado obtenidos a partir de *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R, como el caso de la PYO. Así, se puede sugerir que los costos de producción de metabolitos como PYO podrían disminuir, si se considera en primer lugar, que el tratamiento al glicerol crudo previo a ser utilizado como fuente de carbono para *Pseudomonas aeruginosa* NEJ01R es mínimo. En segundo lugar, que, en los procesos de fermentación microbiana, el costo más elevado está representado por el medio de cultivo, lo cual hace entonces que la incorporación de efluentes industriales como medio de cultivo disminuya tales costos.

Referencias

- Anitha M., Kamarudin A.K., Kofli N.T. (2016) The potential of glycerol as a value-added commodity. *Chemical Engineering Journal*. 295, pp. 119–130.
- Aquino E., Rossi D., Ayub M. (2014) Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol using immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* BLh-1. *Renewable Energy*. 71, pp. 253–257.
- Bagheri S., Muhd J.M., Yehye W.A. (2015) Catalytic conversion of biodiesel derived raw glycerol to value added products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 4, pp. 13–127.
- Bewley B., Berkaliev A., Henriksen H., Ball D., Ott L. (2015) Waste glycerol from biodiesel synthesis as a component in deep eutectic solvents. *Fuel Processing Technology*. 138, pp. 419–426.
- Chavarria H.J., Ordóñez L., Barahona P.L., Castro Gomez M., Paredes Cervantes S. (2016) Perspectives on the utilization of waste fat from beef cattle and fowl for biodiesel production in Mexico. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 92, pp. 899–905.
- Chung L.Y., Chen X.J., Huang C.Y., Yuan Y.J., Chang J.S. (2013) Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*. 38, pp.15815–15822.
- Cofré O., Ramírez M., Gómez J.M., Cantero D. (2016) Pilot scale fed-batch fermentation in a closed loop mixed reactor for the biotransformation of crude glycerol into ethanol and hydrogen by *Escherichia coli* MG1655. *Biomass and Bioenergy*. 91:37–47.
- Ferreira T., Ribeiro R., Ribeiro C., Freire D., Coelho M. (2012) Evaluation of 1,2-propanediol production from crude glycerol by *Citrobacter freundii* ATCC 8090. *Chemical Engineering Transactions*. 27, pp.157–162.
- Franca R.G., Souza P.A., Lima E.R., Costa A.L. (2017) An extended techno-economic analysis of the utilization of glycerol as an alternative feedstock for methanol production. *Clean Technologies Environmental Policy*. doi 10.1007/s10098-017-1391-4.
- Gonzalez G. A., Gonzalez M.M., Guillen G.G. (2017) High-value propylene glycol from low-value biodiesel glycerol: A techno-economic and environmental assessment under uncertainty. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. 5, pp. 5723–5732.
- Hájek M., Skopal F. (2010) Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. *Bioresource Technology*. 101, pp. 3242–3245.
- Hasana M.M., Rahmana M.M. (2017) Performance and emission characteristics of biodiesel diesel blend and environmental and economic impacts of biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 74, pp. 938–948.
- He Q., McNutt J., Yang J. (2017) Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 71, pp. 63–76.
- Hejna A., Kosmela P., Formela K., Piszczyk L., Haponiuk J.T. (2016) Potential applications of crude glycerol in polymer technology—Current state and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 66, pp. 449–475.
- Lee C.S., Aroua M.K., Daud W.M., Cognet P., Lucchese Y.P., Fabre P.L., Reynes O., Latapie L. (2015) A review: Conversion of bioglycerol into 1,3-propanediol via biological and chemical method. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 42, pp. 963–972.
- Macedo R.J., Senna L.F., Machado A.C., Machado C.A., Rodrigo Volcan A.R., Goncalves T.F., Valeroe F., Guimarães F.D. (2017) Production of recombinant lipase B from *Candida antarctica* in *Pichia pastoris* under control of the promoter PGK using crude glycerol from biodiesel production as carbon source. *Biochemical Engineering Journal*. 118, pp. 123–131.
- Maru B.T., López F., Kengen S.W., Constantí M., Medina F. (2016) Dark fermentative hydrogen and ethanol production from biodiesel waste glycerol using a co-culture of *Escherichia coli* and *Enterobacter* sp. *Fuel*. 186, pp. 375–384.
- Marx S. (2016) Glycerol-free biodiesel production through transesterification: a review. *Fuel Processing Technology*. 151, pp.139–147.
- Miran F., Mumtaz M.W., Mukhtar H., Danish M. Value-added use of residual glycerol from biodiesel production process via the optimized synthesis of alkyd resins. (2017) *Process Safety and Environmental Protection*. 109, pp. 659–669.
- Oliveira F, M., Santana F. V. (2016) Optimization of biohydrogen yield produced by bacterial consortia using residual glycerin from biodiesel production. *Bioresource Technology*. 219, pp. 365–370.

Ruiz H.A., Martínez A., Vermerris W. (2016) Bioenergy Potential, Energy Crops, and Biofuel Production in Mexico. *Bioenergy Research*. 9, pp. 981–984.

Saini M., Wang W.Z., Chiang C.J., Chao Y.P. (2017) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of n-butanol from crude glycerol. *Biotechnology Biofuels*. 10, p. 173.

Selfa T., Bain C., Moreno R., Eastmond A., Sweitz S., Bailey C., Simas P.G., Souza T., Medeiros R. (2015) Interrogating social sustainability in the biofuels sector in Latin America: tensions between global standards and local experiences in Mexico, Brazil, and Colombia. *Environmental Management*. 56, pp. 1315–1329.

Tacias P. V., Quintero R. A., Torrestiana S.B. (2016) Evaluación y caracterización de grasas y aceites residuales de cocina para la producción de biodiésel: un caso de estudio. *Revista Internacional Contaminación Ambiental*. 32, pp. 303–313.

Yang F., Hanna M., Sun R. (2012) Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for biofuels*. 5, pp. 1–12

Yong, X.Y., Yan, Z.Y., Shen, H.B., Zhou, J., Wua, X.Y., Zhang, L.J., Zheng, T., Jiang, M., Wei, P., Jia, H.H., Yong, Y.C. (2017) An integrated aerobic-anaerobic strategy for performance enhancement of *Pseudomonas aeruginosa*-inoculated microbial fuel cell. *Bioresource Technology*. 241, pp. 1191–1196.