



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y
TECNOLOGÍA AVANZADA

**BACTERIORODOPSINA:
ELABORACIÓN DE UN MEDIO DE
CULTIVO PARA *H. SALINARUM* CON
REACTIVOS GRADO INDUSTRIAL.**

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA

PRESENTA
RODOLFO MORA GUTIERREZ



DIRECTOR DE TESIS
DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ

Querétaro, México, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Esta tesis es la suma de muchos esfuerzos, primero quiero dar gracias a mis padres por darme la vida, a mis hermanos y abuelos por estar conmigo cuando más los necesito y darme su apoyo incondicional.

Agradezco a Nancy Estefani Llanas Bañuelos, a sus padres y hermano por todo el apoyo y conocimiento brindado que me han dado en estos 5 años y que sean muchos más.

Doy gracias a mi tutor, el Dr. Mauricio Díaz Muñoz y a todo su equipo de trabajo, por sus consejos, su apoyo y sobre todo, por la calidad de ser humano que es.

Estoy en deuda con el Maestro Carlos Lozano, la Maestra Maria Laura Gonzáles y a la Dra. Ofelia Mora, porque sin ellos no hubiese sido posible haber hecho este trabajo, gracias por haberme permitido ocupar un espacio en su laboratorio y muchas gracias por su amistad y atención brindada les deseo mucho éxito y muchos buenos deseos.

Por último, quiero agradecer a las empresas que donaron los reactivos grado industrial para poder realizar este trabajo y al Dr. Victor Castaño por despertar en mí el interés en la fotocatalisis, partiendo de allí mi interés por los sistemas biológicos impulsados por luz, como es el caso de la Bacteriorodopsina.

Un fuerte abrazo y saludo a todos mis compañeros de clases.

¡Pura Vida!

R esumen

En la investigación utilizamos reactivos de grado analítico, que, por su alta pureza, nos garantiza tener repetitividad nuestros experimentos, al estar libres de factores indeseables, sin embargo, cuando se busca que la investigación genere un producto industrial, los costos de producción utilizando estos reactivos son muy elevados y muchas veces se desconoce si el utilizar reactivos de grado industrial, nos den los mismos resultados. Este trabajo compara los resultados que se obtienen al realizar un cultivo de *H. salinarum* utilizando reactivos grado analítico contra reactivos grado industrial para la elaboración del medio de cultivo. Por medio de un espectroscopio, determinamos el crecimiento y desarrollo que está teniendo la arque en cada uno de los medios y la concentración en la etapa estacionaria.

Los resultados obtenidos en este trabajo son alentadores y nos hace pensar que es posible desarrollar un producto industrial a base Bacteriorodopsina, al lograr mejores rendimientos utilizando reactivos grado industrial y, además, reducimos en un 99% los costos para la elaboración del medio de cultivo, cabe mencionar que para obtener 1 gr de Bacteriorodopsina requerimos de 20 litros del medio de cultivo.

Palabras Clave: *H. salinarum*, Bacteriorodopsina, medio de cultivo, concentración, reactivos.

Índice

Antecedentes	5
Introducción	6
I. Bacteriorodopsina.....	8
II. Fotociclo de la Bacteriorodopsina.....	11
III. Etapas del Fotociclo.....	12
IV. Uso de la Bacteriorodopsina en la Producción de Energía.....	14
Planteamiento del Problema	16
Justificación	17
Objetivo Principal	18
Metodología	19
I. Medios de Cultivo.....	19
1.1 Medio MC.....	19
1.2 Medio MI.....	20
1.3 Preparación del Medio.....	20
1.4 Conservación del Medio.....	21
II. Selección de <i>H. salinarum</i>	21
III. Medio MI vs MC.....	21
Resultados	22
Análisis de Resultados	23
I. Análisis de <i>H. salinarum</i> , MI vs MC en 660 nm.....	27
II. Análisis de Bacteriorodopsina, MI vs MC en 550 nm.....	30
III. Discusión de Resultados.....	33
IV. Perspectiva.....	33
Conclusiones	34
Bibliografía	35

Antecedentes

La *Halobacterium salinarum* fue nombrada por Harrison y Kennedy en 1922 y clasificada en 1978 como un organismo extremófilo, por su capacidad de vivir en ambientes hiper salinos, donde la concentración de sal supera los 4M. Cuenta con 3 sistemas de generación de energía; Respiración, Fermentación y Fotosíntesis (Oesterhelt et al., 2009). Este último mecanismo ocurre gracias a una proteína llamada Bacteriorodopsina (BR).

En 1969 fue descubierta la Bacteriorodopsina (BR), producida por la arqueobacteria *Halobacterium salinarum*. En 1971 se descubrió que era una proteína similar a la rodopsina, de allí se deriva el nombre, pero no fue hasta 1972 que se descubrió su funcionalidad como bomba de protones inducida por la luz. En 1997 se reportó datos básicos de su estructura molecular y funcionamiento biofísico.

Ya que los mecanismos naturales de producción de energía química a partir de la energía luminosa son extremadamente complejos en fenómenos como la fotosíntesis, el descubrimiento de un sistema tan simple y diferente como la BR, despertó la curiosidad del mundo científico, y repercutió, en el desarrollo de muchos grupos de investigación que dedicados al estudio de la BR y su mecanismo de bombeo de protones. Este interés (junto con el hecho de que la BR se obtenga fácilmente y en grandes cantidades), ha hecho que sea la proteína de transporte, con la función y estructura mejor conocida. La BR se ha utilizado como modelo de estudio para otras proteínas transmembranales como la rodopsina (Hoflack et al., 1994). También se ha utilizado como base en el mundo de la microelectrónica, memorias holográficas (Hampp, 1990; Birge, 1999), memoria óptica (Hampp, 2000), sonda de pH (Padros et al., 2001), microchips informativos (Birge, 1995), y producción de hidrogeno (Wang, 2017), entre otros usos.

Introducción

La *H. salinarum*, tiene forma de barra y cuenta con flagelos que le permiten tener movilidad en su entorno, además produce vesículas de gas que le permiten flotar y ser más competitiva para lograr mantenerse en la superficie de los lagos donde habita (Oren et al., 2005). Actualmente podemos encontrar cultivos en masa de esta arque en Great Salt Lake, Yellowstone National Park, y otros lugares donde la salinidad supere los 4M. Los cultivos en masa de *H. salinarum*, puede reconocerse por su típico color, que es producido por las bacterioruberinas (Stoeckenius et al. 1979).



Figura 1. Laguna salinera de Alicante, el color del agua es provocado por la presencia de *H. salinarum*. Imagen tomada de <http://charmalicantemultiaventura.blogspot.com/2015/04/tour-natur-wellness-in-alicante.html>.

Actualmente se cuenta con 2 secuencias genómicas completas de dos cepas de *H. salinarum*, NRC-1 (Wailap et al., 2000) y R1 (Pfeiffer et al., 2008). El genoma NRC-1 consta de 2,571,010 pares de bases divididas en, un cromosoma grande y dos pequeños. El genoma codifica para 2,360 proteínas y cuenta un gran contenido de G-C (68%). Se ha demostrado que este alto contenido de GC del genoma, aumenta la estabilidad de las cadenas en ambientes extremos (Pfeiffer et al., 2008).

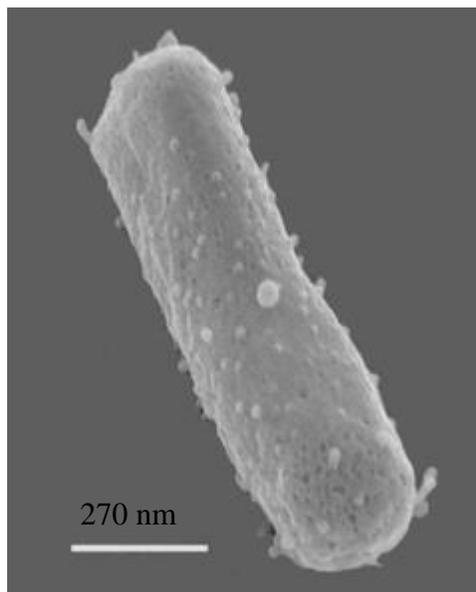


Figura 2. Microscopía de *H. salinarum* NCR-1, se puede apreciar la forma alargada de la arquea. Imagen propia tomada de https://www.researchgate.net/publication/281818000_Halophilic_Archaea_Life_with_Desiccation_Radiation_and_Oligotrophy_over_Geological_Times/download.

I. Bacteriorodopsina.

La Bacteriorodopsina (BR) es una proteína que consta de 248 aminoácidos con un peso molecular de 26 kDa (Ovchinnikov et al., 1979; Dunn et al., 1981), donde resalta la ausencia de histidina y cisteína, así como la gran abundancia de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos. Su estructura consiste de 7 hélices anfipáticas (Figura 1) nombradas de la A a la G conectadas entre sí por bucles citoplasmáticos y extracelulares, con el extremo N-terminal en el lado extracelular y el extremo C-terminal en el lado citoplasmático (Ovchinnikov et al., 1979).

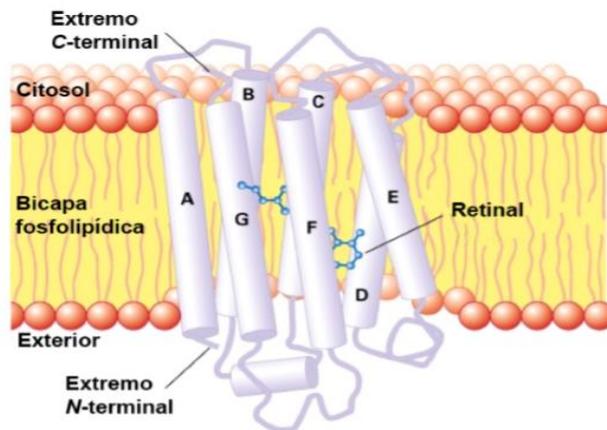


Figura 3. Representación esquemática de la BR en la membrana. La BR cuenta con 7 α -hélices, siendo la hélice G, la que presenta la unión con el retinal. El retinal, es el principal factor del Fotociclo de la BR.
Imagen tomada de <https://www.slideshare.net/iltaitDes/membrana-celular-de-procarriotes>.

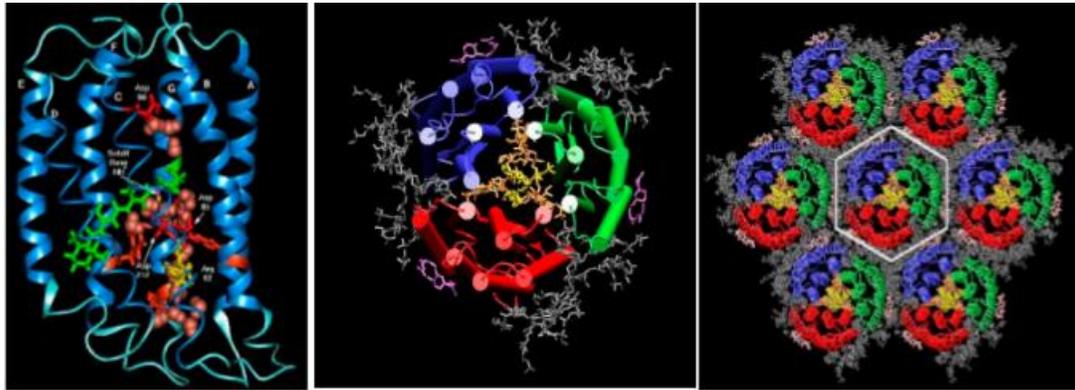


Figura 4. (Izquierda) Estructura terciaria de la BR obtenida a partir de rayos X de cristales de la proteína (Código PDB: 1FBB), las 7 α -hélices se presentan en color azul y el retinal en color verde. (Centro) Trímero de BR, donde cada color es un monómero de BR y los retinales, se presentan en color amarillo. (Derecha) Red hexagonal de trímeros de BR.
 Imagen tomada de <https://www.rcsb.org/structure/1FBB>.

Hacia la mitad de la proteína, casi perpendicular al eje de las hélices, se encuentra unido el retinal mediante una Base de Schiff (BS) protonada.

El retinal es el cromóforo responsable de coloración púrpura, de la absorción de la luz y de iniciar los cambios conformacionales para que la BR bombee protones. Esta última propiedad hace que la proteína sea fácil de localizar, al formar parches de Membrana Púrpura (MP) que tienen forma hexagonal, con un diámetro entre 0.5-1 μm y 45 \AA de espesor (Oesterhelt et al., 1947; Henderson, 1975).

Estos fragmentos de MP poseen una estructura paracristalina consistente en una red hexagonal perfecta de trímeros de BR (Blaurock et al., 1971). Los espacios entre las proteínas están ocupados por lípidos en una porción de 75% proteína y 25% lípidos en peso (Henderson, 1975). Cada monómero está rodeado de unas 6 moléculas lipídicas (Grigorieff et al., 1996).

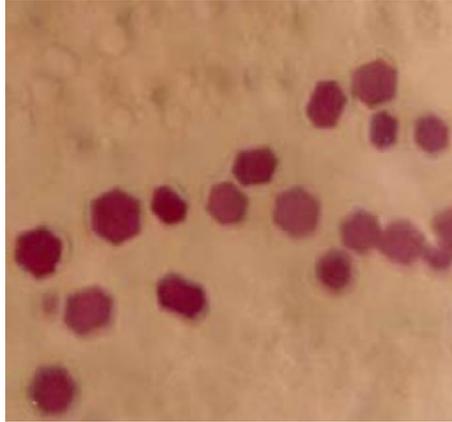


Figura 5. Cristales de BR, en donde se puede apreciar su forma hexagonal y su color. Imagen tomada de la Tesis de doctorado de la Dra. Rosana Simón Vázquez, del centro de estudios de biofísica de la Universidad Autónoma de Barcelona.

La disposición de la BR en trímeros ha demostrado tener más estabilidad en altas temperaturas (Dencheer et al., 1979), debido a la mayor compactación de las hélices existentes en los trímeros (Subramaniam et al., 1991). Se ha reportado que la BR transporta protones de manera más eficiente en estas agrupaciones (Dencheer et al., 1979).

Los fragmentos de MP se reparten homogéneamente en la membrana citoplasmática de la bacteria y puede llegar a abarcar hasta el 50% de la superficie total (Oesterhelt et al., 1973).

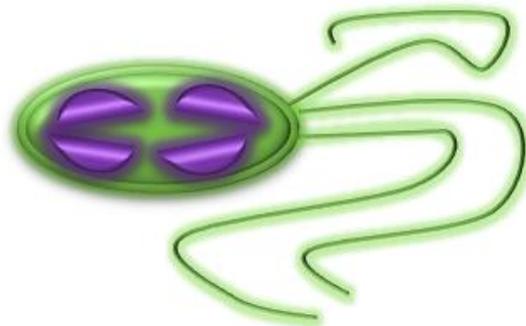
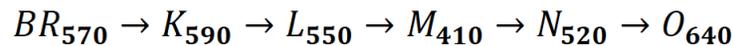


Figura 6. Esquema de *H. salinarum* donde se puede apreciar los parches MP y sus flagelos.

II. Fotociclo de la Bacteriorodopsina

Se llama fotociclo al encadenamiento de cambios estructurales en la BR, que se produce como consecuencia de la absorción de un fotón en el retinal, dando como resultado final el tránsito de un protón desde el lado citoplasmático al lado extracelular. El ciclo dura aproximadamente 100 ms. Se creía que cada ciclo implicaba el movimiento de un solo protón, sin embargo, recientemente se postuló que tal vez sean varios. A cada uno de los cambios conformacionales por los que pasa la BR durante el fotociclo se le denominan estados intermediarios.



Ecuación 1. Estados intermediarios del fotociclo de la BR. Los Subíndices indican la longitud de onda que absorbe la proteína en cada uno de ellos.

La siguiente imagen describe un esquema del fotociclo, indicando cada uno de sus intermediarios y sus tiempos de formación.

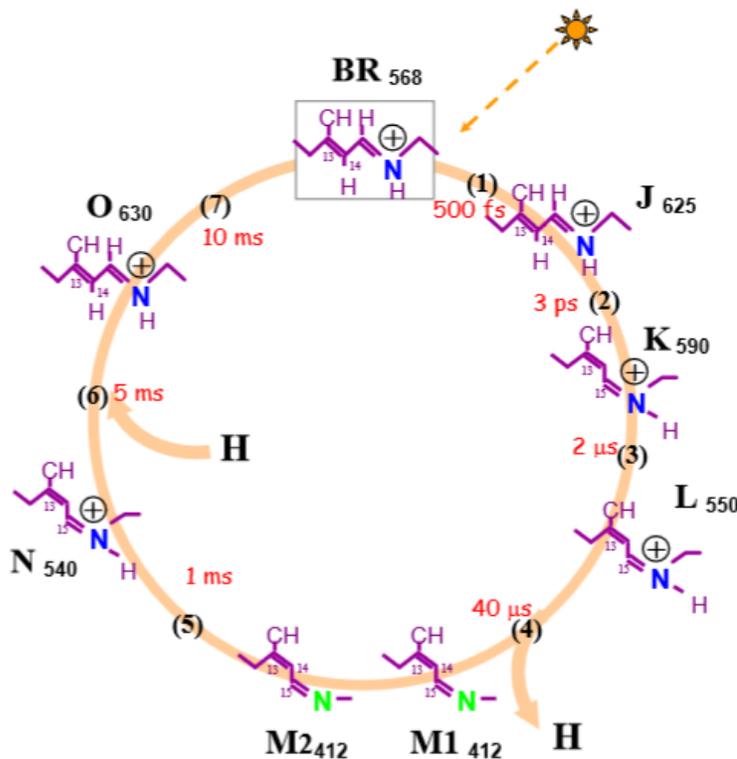


Figura 7. Esquema del fotociclo de la BR. El ciclo comienza cuando un fotón incide en el retinal y ocasiona una reorganización de la densidad electrónica, en el paso J a K, ocurre la isomerización del retinal a 13-cis, 15-trans. En L ocurre un cambio conformacional en el retinal, dando lugar a un movimiento de moléculas de agua, en M ocurre la liberación del protón al espacio extracelular. En N ocurre la reprotonación de la BS. En O retoma su conformación de todo- trans. En color rojo se indica los tiempos. Imagen tomada de la Tesis de doctorado de la Dr. Rosana Simón Vázquez.

III. Etapas del Fotociclo

El fotociclo consta de 10 etapas, en las cuales se distinguen 6 como principales.

- **BR:** Corresponde al estado basal de la proteína antes de comenzar el fotociclo. El retinal se encuentra en conformación “todo-trans”. En este estado la BS se encuentra protonada (Siebert et al., 1983; Earnest et al., 1986).
- **J:** Ocurre una reorganización de la densidad electrónica del retinal entre los enlaces C=C y C-C, pero el retinal permanece en “todo-trans”.
- **K:** En el paso de J a K ocurre la isomerización del retinal de “todo-trans” a “13-cis, 15-anti” (Mathies et al., 1991), provocando cambios en la distribución electrónica del retinal (Siebert et al., 1983).
- **L:** En este estado intermediario ocurre un cambio de entorno en el Asp 96, ocasionado por el movimiento de moléculas de agua en el espacio entre este grupo y la BS, al isomerisarse el retinal. Este movimiento consiste en la relajación de las hélices para promover el nuevo estado conformacional del retinal (Hayashi et al., 2002).
- **M:** El fenómeno más importante ocurre en este intermediario, donde sucede la desprotonación. Se creía que constaba de 2 sub-intermediarios, pero recientemente Layi et al. (2002) descubrieron un tercero.
- **M₁:** Se produce el primer movimiento de protones donde la Base de Schiff se desprotona cediendo su protón al Asp 85.
- **M₂:** El retinal cambia su accesibilidad desde el lado extracelular al lado citoplasmático, relajándose y exponiéndose más al lado citoplasmático. Esto debido a una torsión de las hélices F y G, junto con una rotación de la hélice F.
- **M₂':** Ocurre la liberación del protón al espacio extracelular y se produce una relajación del retinal exponiendo la BS hacia la zona citoplasmática.
- **N:** En el paso de M₂' a N se produce la reprotonación de la BS a partir del Asp96 (Butt et al., 1989; Braiman et al., 1991). La desprotonación del Asp96 se produce gracias a la disminución de su pKa, que ocurre cuando hay una entrada de moléculas de agua al abrirse las hélices en la parte citoplasmática durante M₂.

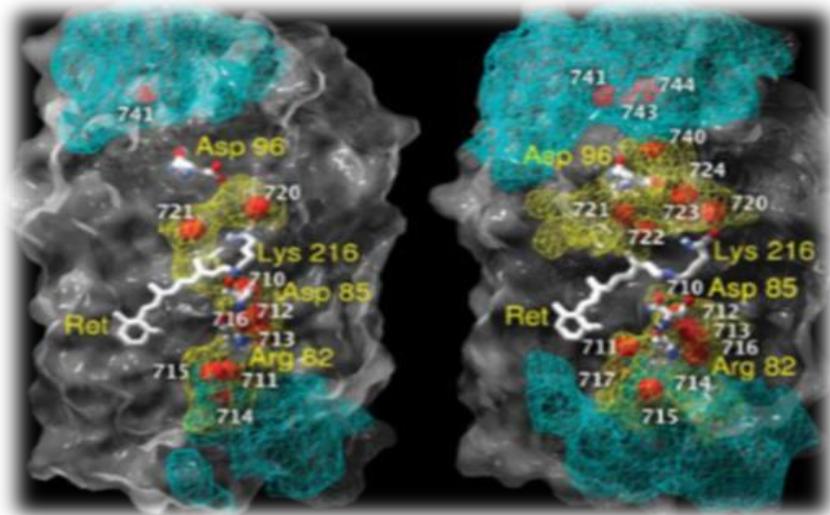


Figura 8. Volúmenes accesibles para las moléculas de agua internas en el estado basal (izquierda) y en el intermedio M2 (Derecha) de la BR. Las redes amarillas representan la superficie que ocupan las moléculas de agua atrapadas y las azules representan la superficie ocupada por las moléculas de agua que puede difundirse. Las bolas rojas representan las moléculas de agua que han podido determinarse por estructura cristalográfica (Grudinin et al., 2005).

- O: En este paso, el retinal se reisomeriza para obtener de nuevo la conformación “todo-trans” que coincide con la protonación del Asp96 (Otto et al., 1998; Bousche et al., 1991). El Asp96 toma el protón del grupo Y (la identidad de este grupo aún no se conoce). Ahora en el paso de O-BR el Asp85 se desprotona, cediendo su protón al grupo X (Bousche et al., 1992). Algunos grupos de investigación creen que este grupo es la Arg82 (Mathies et al., 1991; Govindjee et al., 1996), mientras que otros proponen el Glu204 y Glu194.

Lo anterior sucede cuando el pH del medio es neutro, si el pH se encuentra sobre 9 o entre 5 y 3, el grupo X (desconocido) no libera protón, en su lugar lo realiza el Asp85 junto con el Asp212.

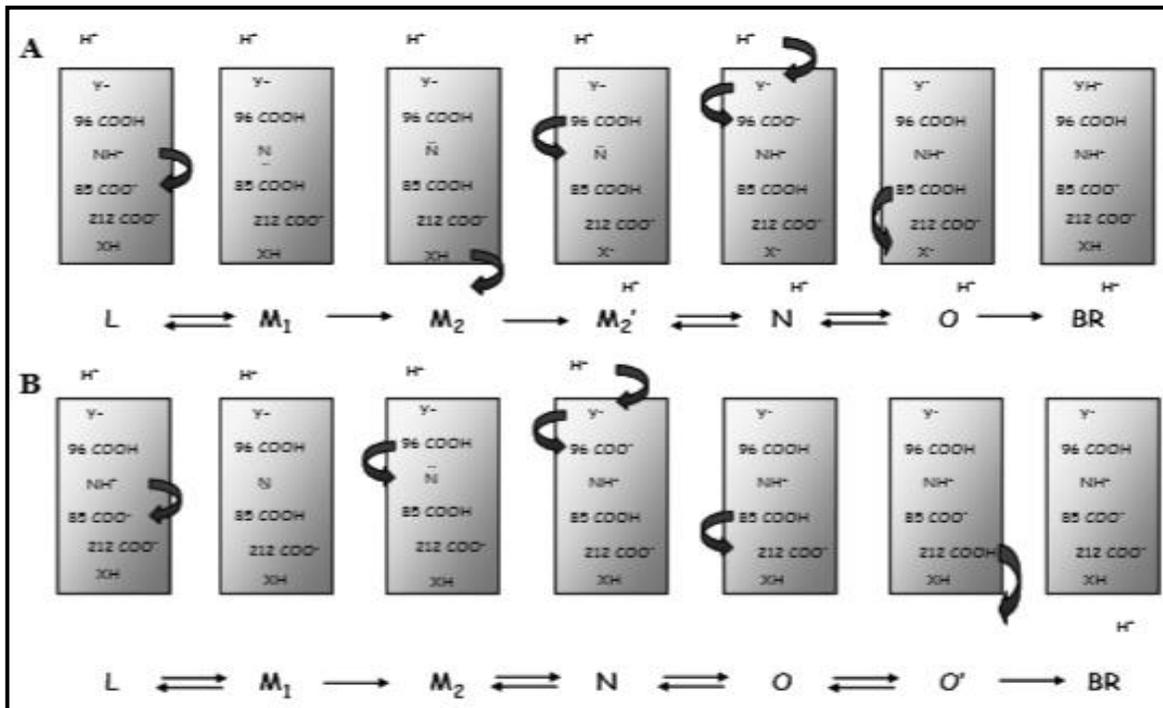


Figura 9. (A) Esquema del fotociclo de la BR nativa a pH neutro. Se representan los diferentes grupos, por los que pasa el protón durante el fotociclo de la BR, desde el lado extracelular (parte de arriba), hasta el citoplasma (parte de abajo), en cada etapa del ciclo. (B) Esquema a pH ácido. Imagen tomada de la Tesis de doctorado de la Dr. Rosana Simón Vázquez.

IV. La Bacteriorodopsina en la Producción de Energía

Las aplicaciones tecnológicas de la BR son múltiples, destacándose la generación de energía. Se han reportado voltajes de hasta 300 mV, en la respuesta fotoeléctrica bajo iluminación constante, usando una concentración de 10-50 µg/ml de BR (Skulachev, 1982).

Otros usos energéticos han sido en celdas solares (Bertoncello et al., 2003; Al-Arife et al., 2013; Thavasi et al., 2009), y recientemente, también se logró la generación de hidrógeno utilizando BR con dióxido de titanio (Wang et al., 2017).

La BR al ser una bomba de protones impulsada por luz, logra llevar iones H⁺ de un lado de la membrana al otro, ocasionando una diferencia de potencial (energía estática), que puede ser aprovechada para generar una corriente eléctrica o también para producir hidrógeno, que a su vez, puede ser aprovechado por una celda de combustible para producir electricidad.

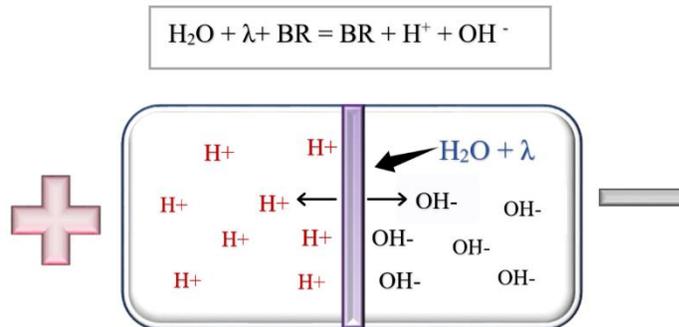


Figura 10. Batería conformada por un medio de H_2O y NaCl . El medio se encuentra separado por una membrana que contiene BR (franja morada) orientadas hacia un mismo lado, con la finalidad de tener un solo sentido en el flujo de H^+ . El flujo comienza con la interacción de una molécula de agua y de un fotón en la BR, la BR toma un H^+ y lo pasa al otro lado de la membrana, esto genera una diferencia de potencia, que, con el tiempo, va aumentando.

Las ventajas de usar BR, es que puede trabajar en temperaturas de hasta $80\text{ }^\circ\text{C}$ en solución y $140\text{ }^\circ\text{C}$ en seco, pH entre 2-12, además es estable en muchos solventes orgánicos no polares y su tiempo de vida es de años en estado seco (Knoblauch, 2014).

Sin embargo, la limitante, además del precio, es la desintegración de la membrana lipídica sobre la que normalmente se coloca, siendo de alrededor de 15 minutos el tiempo de vida media. Pero gracias a los avances de la nanotecnología, se ha incorporado la proteína en otro tipo de materiales (Wang, 2017), extendiendo así, su tiempo de vida funcional hasta años, y promoviendo así nuevas aplicaciones.

Planteamiento del problema

La BR presenta características particulares e interesantes, que son motivo de investigación, y que, gracias a los esfuerzos de numerosos laboratorios, hoy podemos pensar en construir tecnología con esta proteína. Sin embargo, una limitante importante es el precio de adquisición.

Reactivo	Presentación	Marca	Tipo	Precio	Fecha de Cotización
NaCl.	10 kg	Sigma-Aldrich	BioReagent	\$4408 MXM	9/01/19
MgSO ₄ .7H ₂ O.	1 kg	Sigma-Aldrich	BioReagent	\$1887 MXM	9/01/19
Peptona de Soya, por digestión enzimática.	0.5 kg	Sigma-Aldrich	Microbiología	\$5249 MXM	9/01/19
Citrato Sódico, Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .	25 kg	Sigma-Aldrich	FG	\$7658 MXM	9/01/19
KCl.	1 kg	Sigma-Aldrich	BioReagent	\$1695 MXM	9/01/19
CaCl ₂ .	0.5 kg	Sigma-Aldrich	BioReagent	\$5639 MXM	9/01/19

Tabla 1. Costos de los diferentes reactivos utilizados para preparar el medio de cultivo de *H. salinarum*. Consultados del catálogo en línea de Sigma-Aldrich.

Justificación

Al ser una proteína fotosensible, la Bacteriorodopsina tiene múltiples usos. Sin embargo, el costo actual de la proteína en el mercado ronda los \$ 69,235.00 MXM por 5 mg. Es por esta razón que es deseable bajar los costos de producción sin sacrificar la calidad del producto.

Por lo tanto, se busca optimizar la producción a una baja escala, al utilizar reactivos grado industrial. Los resultados permitirán proyectar los gastos y el rendimiento a mayor escala.

bjetivo principal

Implementar un medio de cultivo para *H. salinarum* con reactivos grado industrial y comparar su efectividad con un medio de reactivos grado analítico. Esto permitirá medir la viabilidad de una extracción de Bacteriorodopsina a gran escala, y a su vez, probar la idea de obtener un producto industrial a partir de ella.

I. Objetivos Secundarios

- Aprender las técnicas de cultivo y conservación de *Halobacterium salinarum*.
- Comprender los diferentes procesos de extracción y purificación de *la Bacteriorodopsina*.
- Proponer un medio de cultivo más económico y eficiente.
- Realizar una comparación entre los dos medios.
- Estimar la cantidad de proteína que se lograría extraer con el medio propuesto.
- Proponer una forma de extraer la proteína.

Metodología

I. Medio de Cultivo

Se preparan dos medios; para el primero se utilizan reactivos grado analítico (*Medio MC*) y el segundo con reactivos grado industrial, (*Medio MI*).

1.1 Medio MC

Utilizando los reactivos y cantidades propuestos en la tesis de Doctorado de la Dra. Rosana Simón Vázquez (2009), se prepara el siguiente medio:

Reactivos:

- NaCl250 g
- MgSO₄.7H₂O..... 20 g
- Peptona..... 10 g
- Citrato Sódico, Na₃C₆H₅O₇..... 3 g
- KCl..... 2 g
- CaCl₂..... 0.2 g
- H₂O..... 1 L

La sustitución de la Triptona y el Extracto de Levadura por *Peptona* es para aumentar la expresión de la BR.

1.2 Medio MI

A continuación, se enlista los reactivos empleados en la preparación del Medio MI, utilizando las mismas cantidades del anterior medio:

Reactivo	Marca	Nombre del producto
NaCl.	ROCHE	Sal Grano Industrial
MgSO ₄ .7H ₂ O.	Giles Chemical	Grade Epsom Salt
Citrato Sódico, Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .	ENSIGN	Trisodium Citrate Dihydrate
KCl	Caisa	0-0-62
CaCl ₂ .	Vitro	94%

Nota: Las cantidades utilizadas, son las mismas para ambos medios.

1.3 Preparación del Medio

Equipo y Material:

- Parrilla.
- Agitadores magnéticos.
- Vasos de precipitado de 500 ml y 2 L.
- Pipetas.
- Recipiente para autoclave de 1 L y 500 ml.
- Báscula.
- Autoclave (opcional).

Procedimiento:

Para ambos medios la metodología es la misma. Se colocan 800 ml de agua destilada en un vaso de precipitado junto con todas las sales, colocando primero el NaCl y finalizando con el CaCl₂, así se consigue una mejor disolución. En otro vaso de precipitado se diluye la Peptona en 200 ml de agua destilada. Una vez disuelta, se añade al primer vaso y se deja agitando a menos de 300 r.p.m. hasta que se homogenice la solución, para evitar aglomerados de Peptona.

Por último, se fija el pH en 7.4 y se manda autoclave (opcional), debido a las características del medio (hipersalino), dificulta el crecimiento y supervivencia de otro tipo de organismos ajenos. Es por ello, que no se trabaja con ningún tipo de antibiótico.

1.4 Conservación del Medio

El medio puede conservarse hasta después de 1 mes de haberse preparado, previo a su almacenamiento se debe usar autoclave. No es necesario usar refrigeración, sólo evitar la luz del sol directa.

III. Medio MI vs MC

Equipo extra:

- Espectrofotómetro.
- Matraces de 150 ml y 1 L.

Procedimiento:

Se realizan 2 experimentos, uno con 75 ml y otro con 750 ml de cada medio.

Se colocan los medios en matraces, a continuación, colocamos 0.5 ml de *H. salinarum* en cada matraz. Se tapan los Matraces con papel aluminio, con ello se logra una buena oxigenación y se evita la evaporación excesiva del medio. Se deja en incubación aproximadamente por 14 días a 37 °C y agitación de 250 r.p.m.

Mediciones:

Se realizan lecturas periódicamente conforme lo amerite cada etapa del crecimiento del organismo, utilizado un espectrofotómetro. Se mide la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm y 660 nm, con la primera se estima la producción de membrana púrpura y con la segunda el crecimiento de la arquea.

R Resultados

Las lecturas de la absorbancia fueron adquiridas con el espectrofotómetro “Barnstead” del Lab B-11 del INB. El experimento fue montado el día 18/06/2018 a las 13:15 horas, bajo las condiciones antes mencionadas, usando un equipo de incubación del Lab A-3 del INB.



Foto 1. Montaje del experimento, del lado derecho se encuentra los cultivos con medio grado industrial y del lado izquierdo, los cultivos con medio grado analítico. Se puede apreciar que cada uno de los medios tiene un color en particular, siendo más obscuro el medio de grado industrial. Foto tomada el 18/06/2018.



Foto 2. Experimento en curso, del lado derecho se encuentra los cultivos con medio grado industrial y del lado izquierdo, los cultivos con medio grado analítico. Se puede apreciar que estos últimos adquirieron una tonalidad rosada. Mientras el los otros, se oscurecieron aún más.
Foto tomada el 25/06/2018.

Horas	MI-550 nm		MC-550 nm	
	750 ml	75 ml	750ml	75 ml
24 horas	0.073	0.068	0.024	0.010
48 horas	0.025	0.052	0.026	0.053
72 horas	0.128	0.294	0.026	0.231
96 horas	0.095	0.899	0.066	0.679
120 horas	0.708	1.334	0.335	1.394
124 horas	0.903	1.488	0.446	1.407
144 horas	1.204	1.681	1.159	1.604
168 horas	1.482	1.796	1.353	1.720
192 horas	1.646	1.883	1.450	1.664
216 horas	1.602	1.765	1.344	1.653
240 horas	1.638	1.809	1.302	1.632
264 horas	1.699	1.948	1.258	1.595
288 horas	1.630	1.852	1.294	1.537
312 horas	1.671	1.907	1.263	1.570
336 horas	1.633	1.803	1.279	1.474

Tabla 2. Datos de absorción a 550 nm, los datos en color gris corresponden al medio grado industrial y los azules al medio grado analítico. La absorción a 550 nm nos indica la producción de Bacteriorodopsina.

Horas	MI-660 nm		MC-660 nm	
	750 ml	75 ml	750ml	75 ml
24 horas	0.062	0.058	0.020	0.007
48 horas	0.023	0.040	0.021	0.041
72 horas	0.104	0.221	0.017	0.169
96 horas	0.066	0.679	0.072	0.792
120 horas	0.639	1.078	0.401	1.122
124 horas	0.676	1.144	0.327	1.072
144 horas	0.978	1.359	0.809	1.269
168 horas	1.142	1.465	1.001	1.314
192 horas	1.237	1.449	1.016	1.195
216 horas	1.134	1.307	0.904	1.204
240 horas	1.142	1.376	0.931	1.174
264 horas	1.210	1.456	0.883	1.220
288 horas	1.100	1.383	0.942	1.163
312 horas	1.164	1.437	0.878	1.194
336 horas	1.182	1.397	0.904	1.144

Tabla 3. Datos de absorción a 660 nm, los datos en color negro corresponden a los del medio grado industrial y los grises al medio grado analítico. La absorción a 660 nm nos indica el crecimiento del organismo *H. salinarum*.

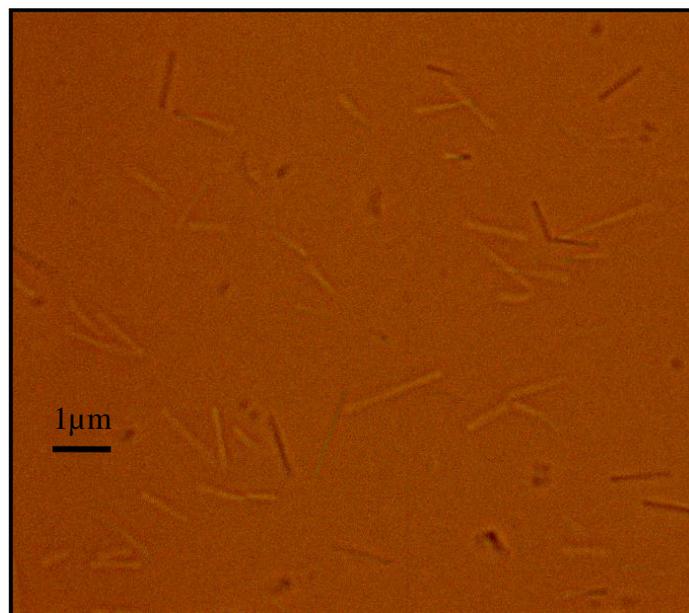
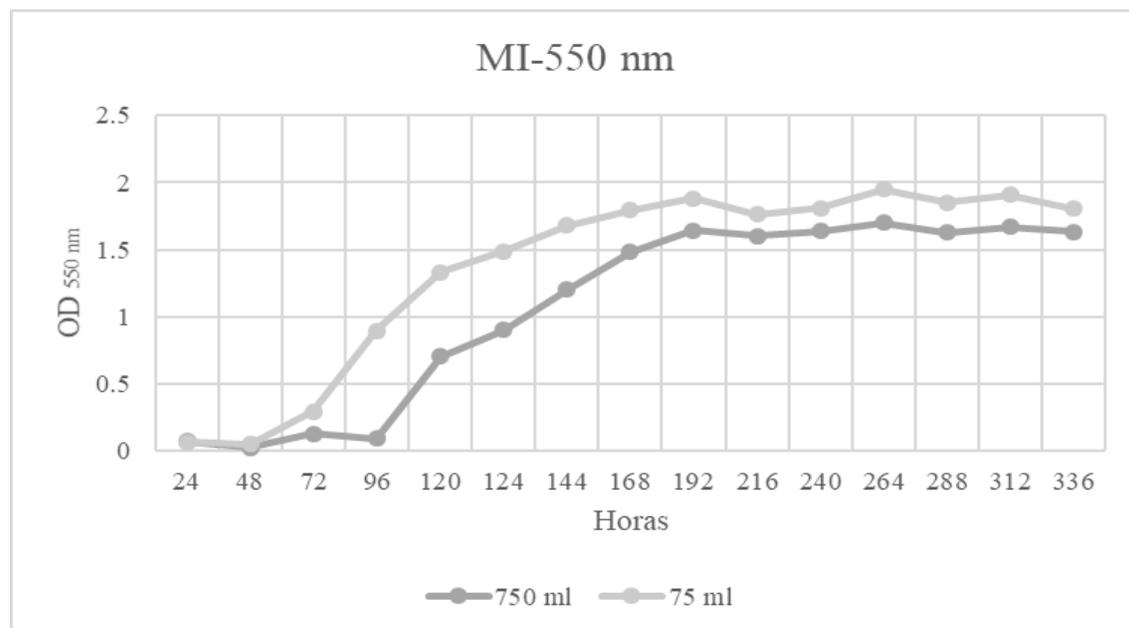


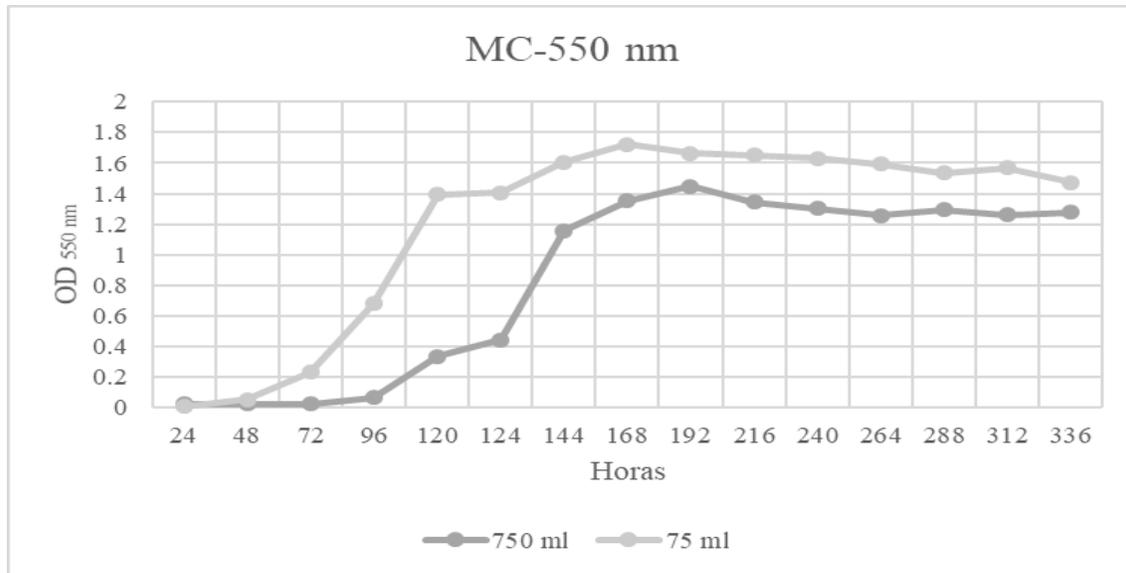
Figura 11. Cultivo de *H. salinarum*, se puede apreciar la forma alargada de la arquea. Imagen propia tomada en el laboratorio.

Análisis de resultados

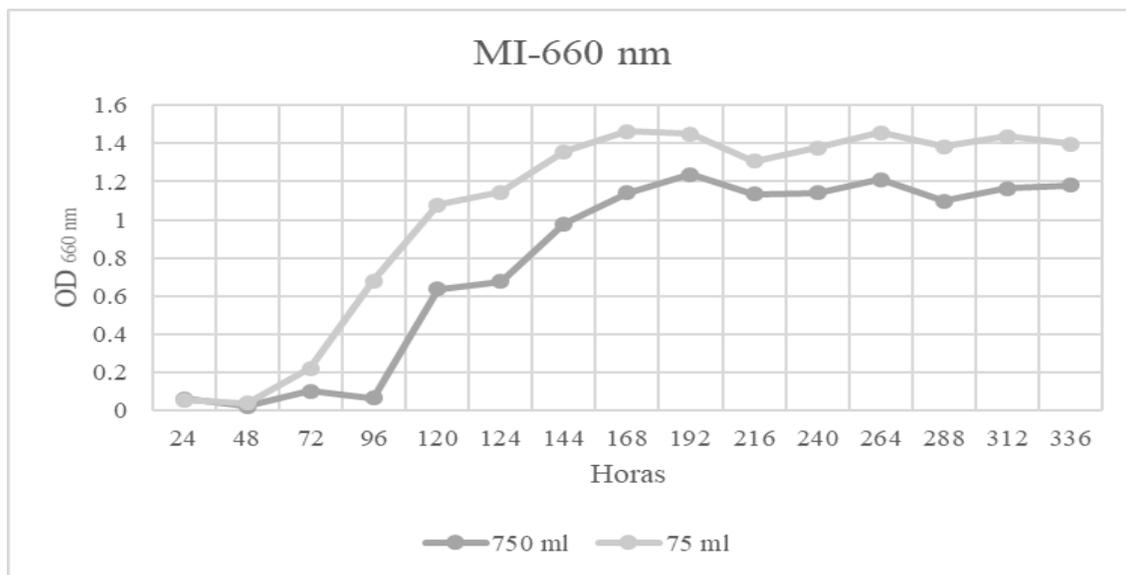
Comenzamos comparando la producción de Bacteriorodopsina (550 nm) y el crecimiento de la arquea (660 nm) para cada medio, teniendo como variante la cantidad inicial del medio (750 ml, 75 ml).



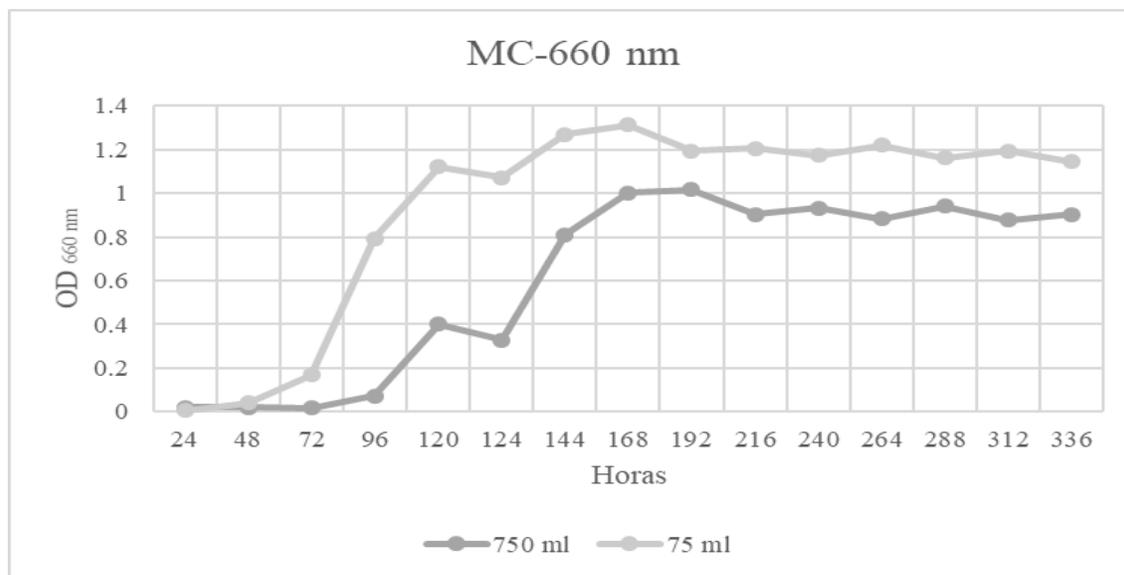
Gráfica 1. Datos de absorción a 550 nm, del medio grado industrial. Se puede apreciar la diferencia entre los 750 ml y los 75 ml. La absorción a 550 nm nos indica la producción de Bacteriorodopsina.



Gráfica 2. Datos de absorción a 550 nm, del medio grado analítico. Se puede apreciar la diferencia entre los 750 ml y los 75 ml. La absorción a 550 nm nos indica la producción de Bacteriorodopsina.



Gráfica 3. Datos de absorción a 660 nm, del medio grado industrial. Se puede apreciar la diferencia entre los 750 ml y los 75 ml. La absorción a 660 nm nos indica el crecimiento de la *H. salinarum*.

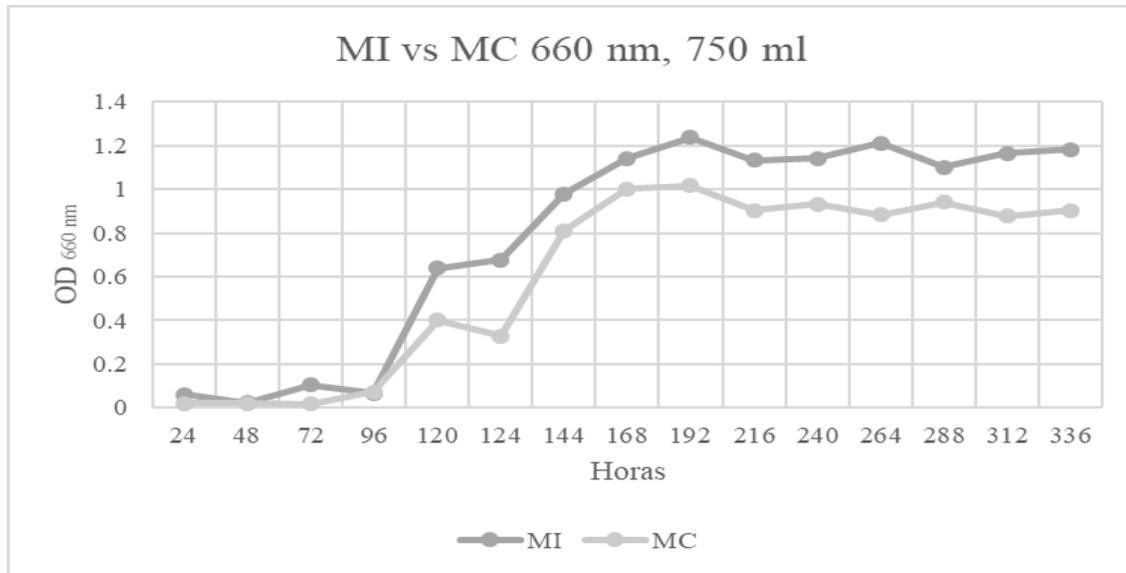


Gráfica 4. Datos de absorción a 660 nm, del medio grado analítico. Se puede apreciar la diferencia entre los 750 ml y los 75 ml. La absorción a 660 nm nos indica el crecimiento de la *H. salinarum*.

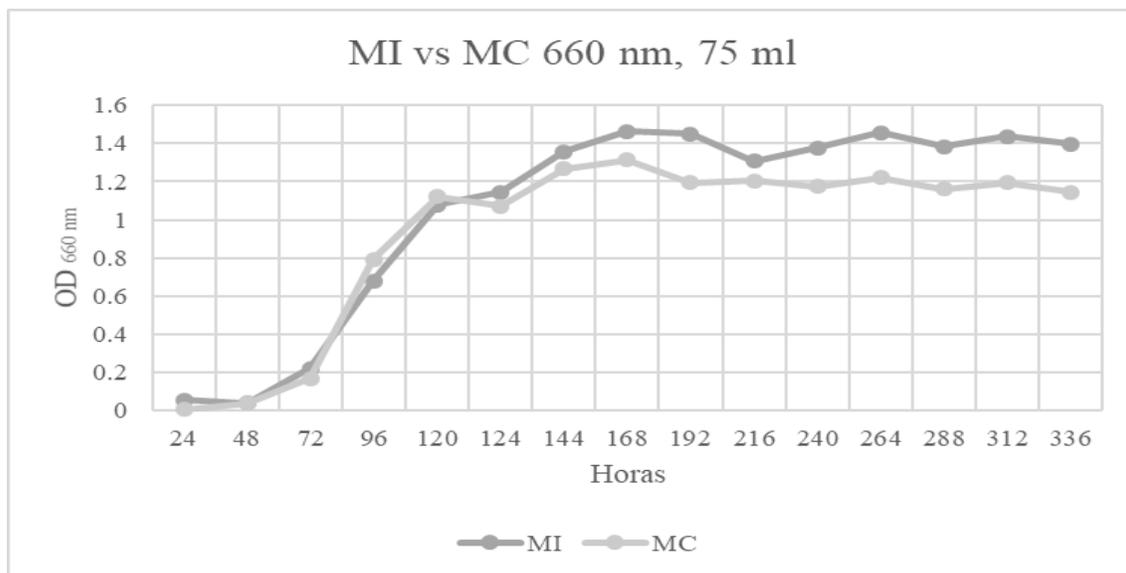
Podemos observar que, en ambos medios, la producción de Bacteriorodopsina y el crecimiento de la arque, alcanzo niveles más altos de concentración, donde la cantidad inicial del medio fue menor (75 ml). Esta observación es relevante, debido a que, si el proceso se llevara a cabo a gran escala, se debe buscar la forma más optima de cultivo, sin embargo, con la información que tenemos, no podemos saber la razón de lo que estamos observado, creemos que puede deberse a la aireación de cada matraz, siendo mayor en 75 ml y así favorecer el crecimiento de la arquea. Pero para ello se debe hacer más experimentos.

I. Análisis de *H. salinarum*, MI vs MC en 660 nm.

Es el resultado principal que se persigue en este trabajo, la posibilidad de tener un cultivo de *H. salinarum* con reactivos grado industrial, y que diferencia existía contra uno con reactivos grado analítico.



Gráfica 5. Datos de absorción a 660 nm, del medio grado industrial vs analítico en 750 ml. Se puede apreciar una diferencia en el crecimiento de la *H. salinarum*, siendo mayor la concentración en MI.



Gráfica 6. Datos de absorción a 660 nm, del medio grado industrial vs analítico en 75 ml. Se puede apreciar una menor diferencia que en 750 ml, pero sigue siendo mayor el crecimiento de la *H. salinarum*, en MI.

Horas	750 ml- 660 nm		75 ml-660 nm	
	MI	MC	MI	MC
24 horas	0.062	0.020	0.058	0.007
48 horas	0.023	0.021	0.040	0.041
72 horas	0.104	0.017	0.221	0.169
96 horas	0.066	0.072	0.679	0.792
120 horas	0.639	0.401	1.078	1.122
124 horas	0.676	0.327	1.144	1.072
144 horas	0.978	0.809	1.359	1.269
168 horas	1.142	1.001	1.465	1.314
192 horas	1.237	1.016	1.449	1.195
216 horas	1.134	0.904	1.307	1.204
240 horas	1.142	0.931	1.376	1.174
264 horas	1.210	0.883	1.456	1.220
288 horas	1.100	0.942	1.383	1.163
312 horas	1.164	0.878	1.437	1.194
336 horas	1.182	0.904	1.397	1.144

Tabla 4. Datos de absorción a 660 nm, se presentan los datos de manera comparativa entre cada medio. Podemos observar el crecimiento del organismo *H. salinarum* en cada medio.

Como se puede observar, los resultados obtenidos son realmente alentadores, ya que en ambos experimentos (750 ml y 75 ml), se aprecia un crecimiento favorable en el medio grado industrial (MI) del organismo *H. salinarum*, además se suma el hecho de que el organismo se desarrolló hasta un 26.5 % mejor en el medio de grado industrial con respecto al medio grado analítico (MC).

Realizamos un promedio de los OD_{660 nm} en etapa estacionaria (192 horas - 336 horas), de cada medio para conocer la diferencia promedio que existió entre el medio MI y MC en ambos experimentos.

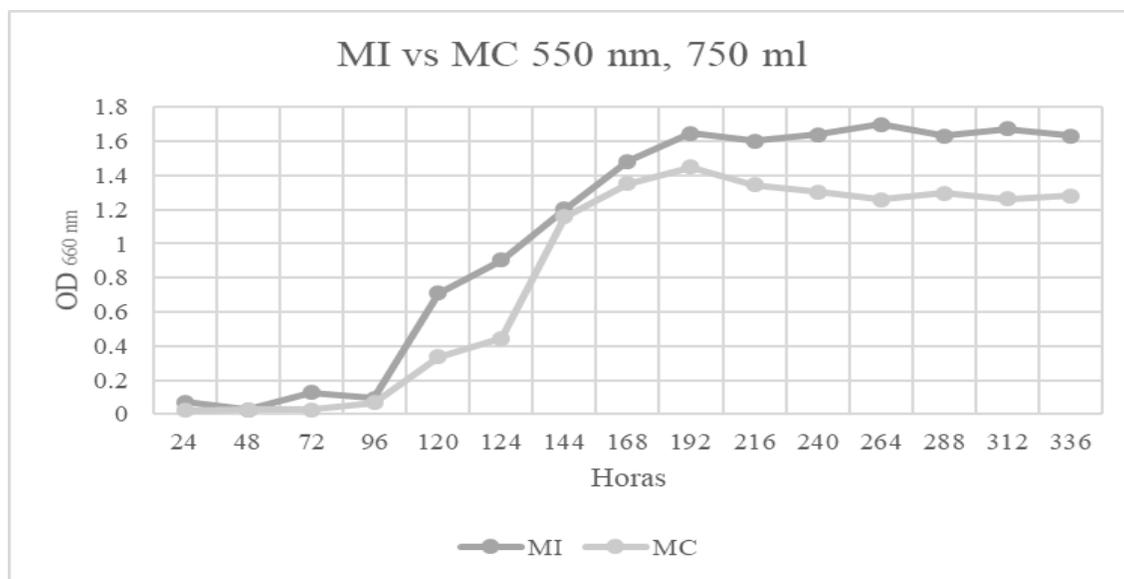
Horas	750 ml- 660 nm		75 ml-660 nm	
	MI	MC	MI	MC
192 horas	1.237	1.016	1.449	1.195
216 horas	1.134	0.904	1.307	1.204
240 horas	1.142	0.931	1.376	1.174
264 horas	1.210	0.883	1.456	1.220
288 horas	1.100	0.942	1.383	1.163
312 horas	1.164	0.878	1.437	1.194
336 horas	1.182	0.904	1.397	1.144
Promedio	1.167	0.922	1.400	1.184

Tabla 5. Cálculo de promedios de OD_{550 nm} en etapa estacional.

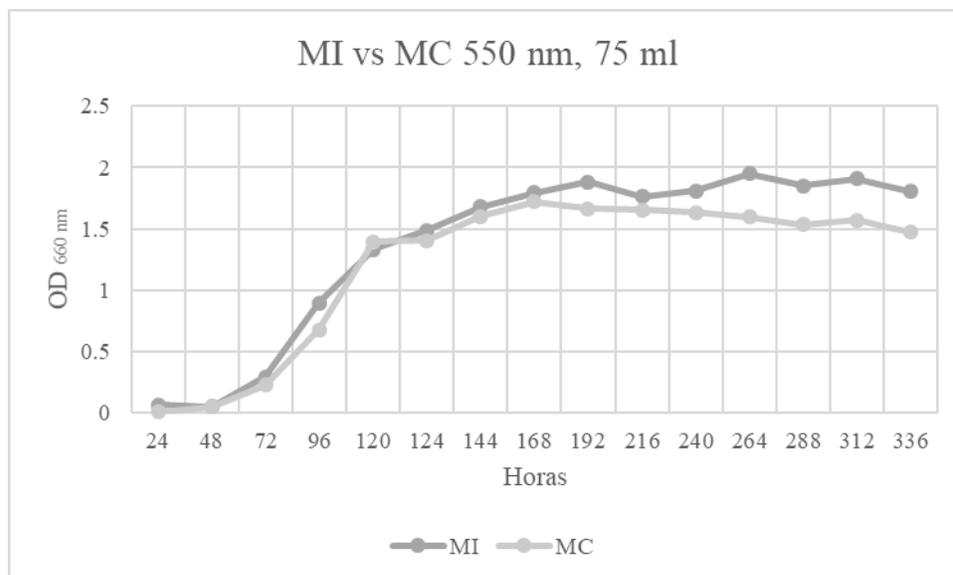
Con estos datos podemos decir que el crecimiento de *H. salinarum* en 750 ml para el medio grado industrial (MI), fue **26.5%** mayor respecto al medio grado analítico (MI). Para el caso de 75 ml fue del **18.2%**.

II. Análisis de *Bacteriorodopsina*, MI vs MC en 550 nm.

A continuación, se realiza el mismo análisis para la producción de *Bacteriorodopsina*.



Gráfica 7. Datos de absorción a 550 nm, del medio grado industrial vs analítico en 750 ml. Se diferencia en la producción de BR en la etapa estacional del crecimiento del organismo.



Gráfica 8. Datos de absorción a 550 nm, del medio grado industrial vs analítico en 75 ml. La diferencia es menor entre ambos, pero sigue habiendo una mayor producción de BR en el medio grado industrial en la fase estacionaria, puede ser gracias a que existe una mayor concentración de *H. salinarum* en el medio MI.

Horas	750 ml- 550 nm		75 ml-550 nm	
	MI	MC	MI	MC
24 horas	0.073	0.024	0.068	0.010
48 horas	0.025	0.026	0.052	0.053
72 horas	0.128	0.026	0.294	0.231
96 horas	0.095	0.066	0.899	0.679
120 horas	0.708	0.335	1.334	1.394
124 horas	0.903	0.446	1.488	1.407
144 horas	1.204	1.159	1.681	1.604
168 horas	1.482	1.353	1.796	1.720
192 horas	1.646	1.450	1.883	1.664
216 horas	1.602	1.344	1.765	1.653
240 horas	1.638	1.302	1.809	1.632
264 horas	1.699	1.258	1.948	1.595
288 horas	1.630	1.294	1.852	1.537
312 horas	1.671	1.263	1.907	1.570
336 horas	1.633	1.279	1.803	1.474

Tabla 6. Datos de absorción a 550 nm, se presentan los datos de manera comparativa entre cada medio. Podemos observar mejor la diferencia en la producción de BR en cada medio.

Realizamos el cálculo promedio de OD_{550 nm} en el periodo estacionario (192 horas - 336 horas) de cada medio.

Horas	750 ml- 550 nm		75 ml-550 nm	
	MI	MC	MI	MC
192 horas	1.646	1.450	1.883	1.664
216 horas	1.602	1.344	1.765	1.653
240 horas	1.638	1.302	1.809	1.632
264 horas	1.699	1.258	1.948	1.595
288 horas	1.630	1.294	1.852	1.537
312 horas	1.671	1.263	1.907	1.570
336 horas	1.633	1.279	1.803	1.474
Promedio	1.645	1.312	1.852	1.589

Tabla 7. Cálculo de promedios de OD_{550 nm} en etapa estacional.

Con estos datos podemos decir que la producción de BR en 750 ml para el medio grado industrial (MI), fue **25.3%** mayor respecto al medio grado analítico (MI). Para el caso de 75 ml fue del **16.6%**.

Regresando a las primeras gráficas de este análisis, donde observamos el fenómeno de un mayor crecimiento de *H. salinarum* en el matraz de 75 ml con respecto al de 750 ml. Usando el periodo estacionario (192 horas - 336 horas). Calculamos dichas diferencias para ambos medios, como un dato útil para futuros experimentos. Siendo de 20.0 % para MI y de 28.4% para el medio MC.

Horas	MI-660 nm		MC-660 nm	
	750 ml	75 ml	750ml	75 ml
192 horas	1.237	1.449	1.016	1.195
216 horas	1.134	1.307	0.904	1.204
240 horas	1.142	1.376	0.931	1.174
264 horas	1.210	1.456	0.883	1.220
288 horas	1.100	1.383	0.942	1.163
312 horas	1.164	1.437	0.878	1.194
336 horas	1.182	1.397	0.904	1.144
Promedio	1.167	1.400714	0.922571	1.184857

Tabla 8. Cálculo de promedios de OD_{660 nm} en etapa estacional.

III. Discusión de Resultados.

Resulta obvio pensar que al tener una mayor concentración de *H. salinarum* se podría extraer más BR del cultivo, inclusive, podríamos decir de forma hipotética que obtendríamos un 26.5% más de BR con este medio. Si tomando en cuenta los rendimientos reportados en la tesis de la Dra. Rosana Simón Vázquez (2009), donde obtuvo un 1 gr de BR por cada 20 litros de medio, podríamos decir que utilizando el medio propuesto se puede obtener 1.265 gr de BR por cada 20 litros de medio.

Consideramos el costo de la BR del mercado por 5 mg, podríamos decir que en términos económicos el rendimiento extra representaría más de \$18,285,000.00 MXN, lo cual es muy significativo, abonado a lo anterior, tenemos una reducción del costo del medio en un 99%.

Claro que todo esto es de forma hipotética, habrá que realizar un trabajo posterior de extracción, siguiendo las metodologías propuestas en la literatura y así poder comprobar esta hipótesis, sin embargo, lo que sí es un hecho y que era el objetivo principal de este trabajo, logramos reducir en un 99% el costo del medio y confirmamos que nuestro medio es apto para el crecimiento y desarrollo de la *H. salinarum*.

IV. Perspectivas.

Estos resultados nos permiten pensar en que es posible realizar un producto industrial basado en BR a bajo costo, y nos abre el camino para pensar en las siguientes etapas.

- Realizar una comparación de rendimientos de extracción de BR, utilizando el medio de grado industrial contra los resultados reportados en la literatura. Esto nos permitirá medir de forma cuantitativa y económico los costos de producción y con ello obtener un rendimiento y un posible costo de venta.
- El siguiente paso es colocar la BR sobre una membrana lipídica o algún material sintético, donde pueda estar estable ante cambios físicos y químicos, y pueda ejercer su función de bombear H⁺. Esto sentara las bases para desarrollar una batería o celda de hidrogeno basa en BR, gracias a su propiedad de interés como bomba de protones impulsada por luz, creemos que puede ser una opción para generar hidrogeno verde que después puede ser transformado a electricidad por medio de una celda de combustible.

Conclusión

En base a los resultados que se obtuvieron, el crecimiento y desarrollo de *H. salinarum* en el medio industrial es posible y recomendable, generamos un ahorro aproximado de \$154 pesos por cada litro de medio preparado con respecto al uso de reactivos grado analítico, este dato es útil, si consideramos que para obtener 1 gr de BR se debe hacer un cultivo de 20 litros (Rosa Simón, 2009).

Otro dato importante, es el rendimiento obtenido en el MI bajo las condiciones en las que se realizó el experimento. El crecimiento *H. salinarum* fue de hasta 26.5 % más y la producción de BR de hasta 25.3% mayor con respecto al MC.

Este trabajo nos permite continuar con la siguiente etapa del proyecto, que es la extracción de BR a gran escala, y analizaremos el fenómeno que observamos al principio del análisis de resultados, el hecho de que en 75 ml obtuvimos una mayor concentración de *H. salinarum* de hasta un 28.5% más. con respecto al de 750 ml, este fenómeno se presentó en ambos medios.

También nos permite pensar es que es posible realizar un producto industria basado en BR, más en específico, una batería y generador de H⁺, gracias a sus propiedades y a su capacidad de bombear H⁺, podemos crear un medio rico en H⁺, que, a su vez, pueden ser utilizados por una celda de combustible.

Bibliografía

- I. Al-Arife, K., Knopf, G. & Bassi, A. (2013). “Organic Photovoltaic Cells Based On Photoactive Bacteriorhodopsin Proteins”. Proc. SPIE 8615, Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems XI, 86150Q. DOI: 10.1117/12.2004018
- II. Aharon Oren, Nuphar Pri-El, Orr Shapiro & Nachshon Siboni (2005). “Gas vesicles isolated from Halobacterium cells by lysis in hypotonic solution are structurally weakened”. Proc. SPIE 8615, FEMS Microbiology Letters, Vol. 252, Page 337-341. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.09.017
- III. Bertonecello P., D. Nicolini, C. Paternolli, V. Bavastrello & C. Nicolini (2003). “Bacteriorhodopsin-Based Langmuir-Schaefer Films For Solar Energy Capture”. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, Vol. 2(2), Pag. 124 – 132. DOI: 10.1109/TNB.2003.813940
- IV. Birge Robert R. (1995). “Protein-Based Computers”. *Scientific American*, Vol. 272 (3), Pag 90-95.
- V. Birge Robert R., Nathan B. Gillespie, Enrique W. Izaguirre, Anakarin Kusnetzow, Albert F. Lawrence, Deepak Singh, Q. Wang Song, Edward Schmidt, Jeffrey A. Stuart, Sukeerthi Seetharaman & Kevin J. Wise(1999). “Biomolecular Electronics: Protein-Based Associative Processors and Volumetric

- Memories". *J. Phys. Chem.* Vol. B 103(49), Pag. 10746-10766. **DOI:** 10.1021/jp991883n
- VI. Blaurock AE & Stoeckenius W (1971). "Structure Of The Purple Membrane" . *Nat New Biol*, Vol. 233(39), Pag. 152–155. **PMID:** 5286750
- VII. Bousché O., M. Braiman, Y. W. He, T. Marti, H. G. Khorana & K. J. Rothschild (1991). "Vibrational Spectroscopy Of Bacteriorhodopsin Mutants. Evidence That ASP-96 Deprotonates During The M---N Transition". *J. Biol. Chem.*, Vol. 266, Pag. 11063-11067.
- VIII. Bousché Olaf, Sanjay Sonar, Mark P. Krebs, H. Gobind Khorana & Kenneth J. Rothschild (1992). "Time-Resolved Fourier Transform Infrared Spectroscopy Of The Bacteriorhodopsin Mutant Tyr-185-E: Asp-96 Reprotonates During O Formation; Asp-85 And Asp-212 Deprotonate During O Decay". *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 56(6), Pag. 1085-1095. **DOI:** 10.1111/j.1751-1097.1992.tb09732.x
- IX. Braiman M. S., O. Bousché & K. J. Rothschild (1991). "Protein Dynamics In The Bacteriorhodopsin Photocycle: Submillisecond Fourier Transform Infrared Spectra Of The L, M, And N Photointermediates". *PNAS*, Vol. 88 (6), Pag. 2388-2392. **DOI:** 10.1073/pnas.88.6.2388
- X. Butt H. J., Bamberg E. & Oesterhelt D. (1989). "Absorption- And Photocurrent-Measurements Of Two Aspartat Mutants Of Bacteriorhodopsin". *J. Protein Chem*, Vol. 8(3), Pag. 347-349. **PMID:** 2789680
- XI. Dunn R., J McCoy, M Simsek, A Majumdar, S H Chang, U L Rajbhandary, & H G Khorana (1981). "The Bacteriorhodopsin Gene". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 78 (11), Pag. 6744-6748.
- XII. Earnest TN, Roepe P, Braiman MS, Gillespie J. & Rothschild KJ (1986). "Orientation Of The Bacteriorhodopsin Chromophore Probed By Polarized Fourier Transform Infrared Difference Spectroscopy". *Biochemistry*, Vol. 25(24), Pag. 7793-7798. **PMID:** 3801443
- XIII. Grigorieff N., T.A. Ceska, K.H. Downing, J.M. Baldwin & R. Henderson (1996). "Electron-Crystallographic Refinement Of The Structure Of Bacteriorhodopsin". *Journal of Molecular Biology*, Vol. 259(3), Pag. 393-421. **DOI:** 10.1006/jmbi.1996.0328
- XIV. Govindjee R., S. Misra, S. P. Balashov, T. G. Ebrey, R. K. Crouch, & D. R. Menick (1996). "Arginine-82 Regulates The Pka Of The Group Responsible For The Light-Driven Proton Release In Bacteriorhodopsin". *Biophys J.*, Vol. 71(2), Pag. 1011–1023. **DOI:** 10.1016/S0006-3495(96)79302-5
- XV. Grudin Sergei, Georg Büldt, Valentin Gordeliy & Artur Baumgaertner. "Water Molecules And Hydrogen-Bonded Networks In Bacteriorhodopsin—Molecular Dynamics Simulations Of The Ground State And The M-Intermediate".

- Biophys J.*, Vol. 88(5), Pag. 3252–3261. **DOI:** 10.1529/biophysj.104.047993
- XVI. Hampp N., Bräuchle C., Oesterhelt D. (1990). “Bacteriorhodopsin Wildtype And Variant Aspartate-96 To Asparagine As Reversible Holographic Media”. *Biophys. J.*, Vol. 58, Pag. 83-93. **DOI:** 10.1016/S0006-3495(90)82355-9
- XVII. Hampp N. (2000). “Bacteriorhodopsin As A Photochromic Retinal Protein For Optical Memories”. *Chem. Rev.*, Vol. 100 (5), Pag. 1755–1776. **DOI:** 10.1021/cr980072x
- XVIII. Hayashi Shigehiko, Emad Tajkhorshid & Klaus Schulten (2002). “Structural Changes During The Formation Of Early Intermediates In The Bacteriorhodopsin Photocycle”. *Biophys J.*, Vol. 83(3), Pag. 1281–1297. **DOI:** 10.1016/S0006-3495(02)73900-3
- XIX. Henderson R. & P. N. T. Unwin (1975). “Three-Dimensional Model Of Purple Membrane Obtained By Electron Microscopy”. *Nature*, Vol. 257(5521), Pag. 28-32. **DOI:** 10.1038/257028a0
- XX. Hoflack J., Trumpp-Kallmeyer S., Hibert M. (1994). “Re-Evaluation Of Bacteriorhodopsin As A Model For G Protein-Coupled Receptors”. *Trends Pharmacol Sci.* Vol. 15 (1), Pag. 7-9. **DOI:** 10.1016/0165-6147(94)90119-8
- XXI. Jia Hao, Jocelyn Lee, Kevin & Olachi Oleru (2011). 2011 Summer Interns Institute for Systems Biology. Recuperado el 17 de Febrero 2016, de Baliga Lab Sitio web: <http://baliga.systemsbiology.net/highschool/intern2011/halo.html>
- XXII. Knoblauch Christopher, Mark Griep & Craig Friedrich (2014). “Recent Advances In The Field Of Bionanotechnology: An Insight Into Optoelectric Bacteriorhodopsin, Quantum Dots, And Noble Metal Nanoclusters”. *Sensors*, Vol. 14, Pag. 19731-19766. **DOI:** 10.3390/s141019731
- XXIII. Lajos Keszthely (1982). “[38] Orientation of Purple Membranes by Electric Field”. *Methods In Enzymology*, VOL. 88, Pag. 287-297. **ISBN:** 0-12-181988-4
- XXIV. Lanyi Janos K. (1999). “Bacteriorhodopsin”. *International Review of Cytology*, Vol. 187, Pag. 161-202. **DOI:** 10.1016/S0074-7696(08)62418-3
- XXV. Lanyi Janos K. & Brigitte Schobert (2002). “Crystallographic Structure Of The Retinal And The Protein After Deprotonation Of The Schiff Base: The Switch In The Bacteriorhodopsin Photocycle”. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 321(4), Pag. 727-737. **DOI:** 10.1016/S0022-2836(02)00682-4
- XXVI. Lanyi Ng. W. V., Kennedy S. P., Mahairas G. G., Berquist B., Pan M., Shukla H. D., Lasky S. R., Baliga N. S., Thorsson V., Sbrogna J., Swartzell S., Weir D., Hall J., Dahl T. A., Welti R., Goo Y. A., Leithauser B., Keller K., Cruz R., Danson M. J., Hough D. W., Maddocks D. G., Jablonski P. E., Krebs M.

- P., Angevine C. M., Dale H., Isenbarger T. A., Peck R. F., Pohlschroder M., et al. (2000). "Genome sequence of Halobacterium species NRC-1". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 97 (22), Page 12176–81, **DOI:** 10.1073/pnas.190337797
- XXVII. Maarten P. Heyn & Norbert A. Dencher (1982). "[6] Reconstitution Of Monomeric Bacteriorhodopsin Into Phospholipid Vesicles". *Methods In Enzymology*, VOL. 8. **ISBN:** 0-12-181988-4
- XXVIII. Mathies R. A., S. W. Lin, J. B. Ames & W. T. Pollard (1991). "From Femtoseconds To Biology: Mechanism Of Bacteriorhodopsin's Light-Driven Proton Pump". *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, Vol. 20, Pag. 491-518. **DOI:** 10.1146/annurev.bb.20.060191.002423
- XXIX. Michael T. Madigan, John M. Martinko & Jack Parker (1998). "Brock Biología De Los Microorganismos". ESPAÑA: Octava Edición. *PEARSON*.
- XXX. Michael T. Madigan, John M. Martinko, Kelly S. Bender, Daniel H. Buckley & David A. Stahl (2015). "Brock Biología De Los Microorganismos". ESPAÑA: Catorceava Edición. *PEARSON*.
- XXXI. Miguel A. Reyes & Amparo I. Zavaleta. (2005). "Bacteriorhodopsina: Una Molécula Peculiar". *Ciencia e Investigación*, Vol. 8 (1), Pag. 48-58. **ISSN-L:** 1561-0861
- XXXII. Oesterhelt Dieter, Marion Meentzen & Liselotte Schuhmann(1971). "Reversible Dissociation Of The Purple Complex In Bacteriorhodopsin And Identification Of 13-Cis And All-Trans-Retinal As Its Chromophores". *FEBS Journal*, Vol. 40, Pag. 453–463. **DOI:** 10.1111/j.1432-1033.1973.tb03214.x
- XXXIII. Oesterhelt D. & Walther Stoeckenius (1974). "Isolation Of The Cell Membrane Of Halobacterium Halobium And Its Fractionation Into Red And Purple Membrane". *Methods in Enzymology*, Vol. 31, Pag. 667-678. **DOI:** 10.1016/0076-6879(74)31072-5
- XXXIV. Otto H., T. Marti, M. Holz, T. Mogi, M. Lindau, H. G. Khorana, & M. P. Heyn (1989). "Aspartic Acid-96 Is The Internal Proton Donor In The Reprotonation Of The Schiff Base Of Bacteriorhodopsin". *PNAS*, Vol. 86 (23) Pag. 9228-9232. **PMID:** 2556706
- XXXV. Ovchinnikov Yu. A., N.G.Abdulaev, M.Yu.Feigina, A.V.Kiselev & N.A.Lobanov (1979). "The Structural Basis Of The Functioning Of Bacteriorhodopsin: An Overview". *FEBS Lett.*, Vol. 100 , Pag. 219-224. **DOI:** 10.1016/0014-5793(79)80338-5
- XXXVI. Piet W. M. Van Dijck & Karel Van Dam (1982). "[4] Bacteriorhodopsin In Phospholipid Vesicles". *Methods In Enzymology*, VOL. 88, Pag. 17-25. **ISBN:** 0-12-181988-4
- XXXVII. Pfeiffer F., Schuster S. C., Broicher A., Falb M., Palm P., Rodewald K., Ruepp A., Soppa J.,

- Tittor J. & Oesterhelt D. (2008). "Evolution in the laboratory: The genome of *Halobacterium salinarum* strain R1 compared to that of strain NRC-1". *Genomics*. 91 (4): 335–46. doi:10.1016/j.ygeno.2008.01.001
- XXXVIII. Rober D. Simon (1978). "Halobacterium Strain 5 Contains A Plasmid Which Is Correlated With The Presence Of Gas Vacuoles". *Nature*, Vol. 273(25). **DOI:** 10.1038/273314a0
- XXXIX. Rosana Simón Vázquez (2009). "Influencia De La Movilidad De Las Hélices En La Función De La Bacteriotropina". Tesis Doctoral, UAB.
- XL. V. P. Skulachev (1982). "[7] A Single Turnover Study Of Photoelectric Current-Generating Proteins". *Methods In Enzymology*, VOL. 88, Pag. 35-45. **ISBN:** 0-12-181988-4
- XLI. Siebert Friedrich & Werner Mäntele (1983). "Investigation Of The Primary Photochemistry Of Bacteriorhodopsin By Low-Temperature Fourier-Transform Infrared Spectroscopy". *FEBS Journal*. Vol. 130 (3), Pag. 565–573. **DOI:** 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07187.x
- XLII. Subramaniam S., T. Marti, S. J. Rösselet, K. J. Rothschild & H G Khorana (1991). "The Reaction Of Hydroxylamine With Bacteriorhodopsin Studied With Mutants That Have Altered Photocycles: Selective Reactivity Of Different Photointermediates". *PNAS*, Vol. 88 (6), Pag. 2583-2587. **DOI:** 10.1073/pnas.88.6.2583
- XLIII. Tan Wee Jin (2010). "A Bacteriorhodopsin/Atp Synthase Liposome System For Light-Driven Atp Productio". Tesis de maestria, NUS.
- XLIV. Thavasi, V., Lazarova, T., Filipek, S., Kolinski, M., Querol, E., Kumar, A., Ramakrishna, S. & Padros, E. (2009). "V. Study On The Feasibility Of Bacteriorhodopsin As Bio-Photosensitizer In Excitonic Solar Cell". *J. Nanosci. Nanotechnol*, Vol. 9(3), Pag. 1679–1687. **DOI:** 10.1166/jnn.2009.SI07
- XLV. Walther Stoeckenius, Richard H. Lozier & Roberto A. Bogomolni (1979). "Bacteriorhodopsin And The Purple Membrane Of Halobacteria". *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 505, Pag. 215-278.
- XLVI. YouTube. (2014). "Cromatografía en Columna", UNAM. [online] Available at: <https://www.youtube.com/watch?v=rTergD8MYWo> [Accessed 12 Apr. 2016].