



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



Química Farmacéutico Biológica

Área Farmacia Industrial

MANUAL DE LABORATORIO DE
MICROBIOLOGÍA FARMACÉUTICA

APROBADO POR EL COMITÉ ACADÉMICO DE CARRERA
11 de octubre de 2019



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	1 / 41

MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA FARMACÉUTICA

CÓDIGO: SGC-FESZ-QFB-ML22

AUTORES:

I.B.Q. Abel Blancas Cabrera
MTRA. Dora Alicia Pérez González
MTRA. Yolanda Flores Cabrera
I.B.Q. Susana Méndez Vázquez

ACTUALIZACIÓN:

MTRA. Dora Alicia Pérez González
MTRA. Yolanda Flores Cabrera
I.B.Q. Susana Méndez Vázquez
M en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez

APROBADO POR EL COMITÉ ACADÉMICO DE CARRERA
11 de octubre de 2019



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	2 / 41

ÍNDICE

REGLAMENTO INTERNO DEL LABORATORIO	3/41
EVALUACIÓN	5/41
PRACTICA 1. DISEÑO DE MEDIOS DE CULTIVO	7/41
PRÁCTICA 2. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ÁCIDOS ORGÁNICOS	15/41
PRÁCTICA 3. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO	22/41
PRÁCTICA 4. CRECIMIENTO MICROBIANO	29/41
PRÁCTICA 5. PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS POR MICROORGANISMOS	33/41



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	3 / 41

REGLAMENTO INTERNO DEL LABORATORIO

1. Todos los usuarios del laboratorio deberán seguir las reglas establecidas en el presente reglamento.
2. Sólo se permitirá trabajar en el laboratorio con bata blanca de mangas largas, limpia y cerrada de algodón.
3. Los usuarios del laboratorio deberán utilizar zapatos cerrados.
4. Los usuarios del laboratorio deberán seguir las normas de seguridad e higiene para el control de los deshechos generados.
5. Deberán emplearse guantes de látex, cubre bocas y lentes de seguridad durante el manejo de microorganismos.
6. El cabello debe estar recogido para que de esta manera no interfiera con el desempeño de las actividades del laboratorio.
7. Las superficies de trabajo deben ser descontaminadas antes y después de una sesión de trabajo e inmediatamente después de algún derrame de material contaminante.
8. Los usuarios deberán lavarse las manos antes y después de manipular material contaminante, así como al salir del laboratorio.
9. Todos los medios de cultivo inoculados con microorganismos deberán ser esterilizados antes de ser desechados.
10. Los materiales que estén en contacto con microorganismos deberán ser esterilizados antes de ser lavados o desechados.
11. Los académicos y los alumnos deben conservar el orden y la disciplina durante la práctica.
12. Los usuarios del laboratorio deberán mantenerlo limpio.
13. Todos los resultados y cálculos de la práctica deberán registrarse en una bitácora exclusiva para el laboratorio.
14. Los usuarios del laboratorio deberán de notificar de forma inmediata al responsable en turno, si algún aparato falla o si ocurre alguna contingencia.
15. No se permite pipetear ningún líquido con la boca.
16. Está prohibido ingerir alimentos, bebidas y/o golosinas.
17. Está prohibido fumar dentro del laboratorio.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE
DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA FARMACÉUTICA



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	4 / 41

18. El tiempo de permanencia en el laboratorio no debe exceder del fijado en su horario de práctica.
19. No se permite recibir visitas en el horario de la práctica.
20. Se prohíbe utilizar radio, audífonos y MP3 durante el horario de desarrollo de la práctica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	5 / 41

EVALUACIÓN

El alumno deberá cumplir con el 80% de asistencia para poder ser evaluado. La calificación del Módulo de Microbiología Farmacéutica se divide de la siguiente forma:

Teoría	60% de la calificación.
Laboratorio	40% de la calificación.

No se promedian calificaciones reprobatorias.

El 40% de la calificación del laboratorio se obtiene promediando los siguientes rubros:

- 1) CUESTIONARIO. Se realiza por equipo, en manuscrito y deberá contener al menos 4 referencias.
- 2) EXAMEN. Se realiza al inicio de cada práctica. Es de forma individual y sin ningún tipo de información anexa.
- 3) INFORME. Se realiza por equipo y deberá incluir:

PUNTOS	VALOR
Carátula. Debe contener el nombre de todos los integrantes del equipo que participaron en su elaboración, así como su firma de aprobación.	Requisito
Introducción. La cual será de máximo una cuartilla, en la que se destaquen aspectos relacionados con la práctica correspondiente y no únicamente con los temas teóricos relacionados.	1 punto
Objetivo y diagrama del procedimiento.	1 punto
Resultados. Incluirán los resultados de todo el grupo preferentemente y se deberán emplear gráficas (con la información necesaria para ser autoexplicativas).	2 puntos



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE
DOCENCIA
MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA FARMACÉUTICA



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	6 / 41

Análisis de resultados. Realizar la interpretación de los resultados obtenidos y no solo la descripción de los resultados.	3 puntos
Conclusiones. Deben ser concretas y estar relacionadas con los objetivos y el análisis de resultados de la práctica.	2 puntos
Referencias. Mínimo se incluirán cuatro y deberán ser escritas con base a los criterios de Vancouver.	1 punto
TOTAL	10 puntos

Los tres rubros anteriores tendrán la misma ponderación.

SEMINARIO. (Sin ponderación para la evaluación). Participarán todos los integrantes del equipo, explicando los contenidos y evitando la lectura de información



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	7 / 41

PRÁCTICA 1. DISEÑO DE MEDIOS DE CULTIVO

INTRODUCCIÓN

Un medio de cultivo es una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos.

La preparación de medios para el desarrollo de procesos de fermentación es una etapa fundamental para asegurar la productividad de los mismos.

Los componentes de los medios son los efectores externos de naturaleza química que desempeñan un rol esencial en los procesos ya que deben cumplir con los requerimientos del crecimiento y de formación de productos y además suministrar energía para la síntesis de metabolitos y para el mantenimiento celular.

No obstante que los microorganismos varían considerablemente respecto de los nutrientes que pueden necesitar como se muestra en el cuadro 1.1., es posible efectuar la distinción de las siguientes categorías de componentes: 1) Macronutrientes, agregados en cantidades de gramos por litro que están representados por las fuentes de C, N, S, P, K y Mg; 2) Micronutrientes o elementos trazas representados por las sales de Fe, Mn, Mo, Ca, Zn y Co que se agregan a los medios en cantidades de miligramos o microgramos por litro; y 3) Factores de crecimiento, que están constituidos generalmente por componentes orgánicos suministrados en baja concentración y que no son sintetizados ni metabolizados por las células, sino incorporados a estructuras celulares y de función metabólica específica, como vitaminas, algunos aminoácidos, bases nitrogenadas, ácidos grasos no saturados, etc.

Los medios pueden clasificarse, considerando la naturaleza química de los componentes, en: 1) medios sintéticos o medios químicamente definidos, y 2) medios complejos en cuya composición intervienen sustancias de origen animal o vegetal como peptonas, extracto de levadura, macerado de maíz, harina de soya, etc., que aportan las sustancias fundamentales ya mencionadas, pero que son químicamente indefinidas y de composición variable.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	8 / 41

Diseño de un medio de cultivo

El diseño de un medio de cultivo para ser utilizado a nivel industrial tiene como finalidad la elección de los componentes necesarios para lograr el crecimiento y la formación de productos correspondientes al proceso a desarrollar. Para tal objeto se debe tener en cuenta todos aquellos aspectos relacionados con el microorganismo, el proceso y los sustratos a ser empleados como son los requerimientos nutricionales del microorganismo y algunos específicos del proceso, la disponibilidad real de los componentes y consideraciones sobre las materias primas. Otros aspectos también importantes se refieren a todos los procesos y operaciones previas y posteriores a la etapa de fermentación y al conocimiento de los mecanismos bioquímicos que regulan la formación de algunos productos.

Cuadro 1.1. Composición de elementos para bacterias, levaduras y hongos
(% en peso seco)

Elemento	Bacterias Luria, 1950, Herbert, 1976, Aiba et al., 1973.	Levaduras Aiba et al., 1973; Herbert, 1976.	Hongos Lilly, 1965; Aiba et al., 1973.
Carbono	50-53	45-50	40-63
Hidrógeno	7	7	
Nitrógeno	12-15	7.5-11	7-10
Fósforo	2.0-3.0	0.8-2.6	0.4-4.5
Azufre	0.2-1.0	0.01-0.24	0.1-0.5
Potasio	1.0-4.5	1.0-4.0	0.2-2.5
Sodio	0.5-1.0	0.01-0.1	0.02-0.5
Calcio	0.01-1.1	0.1-0.3	0.1-1.4
Magnesio	0.1-0.5	0.1-0.5	0.1-0.5
Cloro	0.5	-	-
Hierro	0.02-0.2	0.01-0.5	0.1-0.2

Fuente: Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ, 1995.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	9 / 41

OBJETIVO

Comparar diferentes fuentes de nitrógeno necesarias para el crecimiento microbiano utilizando métodos analíticos para evaluar dicho crecimiento.

MATERIAL

- Matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio semilla
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de los diferentes medios de producción
- Tubos con agar PDA o Sabouraud inclinado sembrados con el material biológico
- Pipetas graduadas estériles de 10 mL
- Tubos de 18 x 150 mm con tapa de rosca
- Incubadora con agitación y temperatura controladas
- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm

Microorganismo

Candida utilis

MEDIOS DE CULTIVO

Medio semilla

Glucosa 40.0 g
Fosfato dibásico de potasio 10.0 g
Fosfato monobásico de potasio 10.0 g
Peptona de caseína 10.0 g
Sulfato de amonio 15.0 g
Agua de la llave 1.0 L

Ajustar el pH a 5.5.

Esterilizar a 12 libras de presión durante 15 minutos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	10 / 41

Medio de producción

Glucosa	40.0 g
Fosfato dibásico de potasio	10.0 g
Fosfato monobásico de potasio	10.0 g
Fuente de nitrógeno**	10.0 g
Agua de la llave	1.0 L

Ajustar el pH a 5.5.

Esterilizar a 12 libras de presión durante 15 minutos.

**Fuente de nitrógeno (diferente para cada equipo).

1. Sulfato de amonio
2. Extracto de malta
3. Extracto de levadura
4. Peptona de caseína
5. Urea
6. Nitrato de sodio

MÉTODO

I. Propagación

Tome unas asadas del cultivo de *Candida utilis* e inocule el matraz que contiene el medio semilla e incube con agitación a 200 rpm y 28 °C durante 24 h.

Prepare 100 mL de medio de producción para cada una de las fuentes de nitrógeno e inocule con un mL del cultivo con medio semilla, incúbelos en agitación a 200 rpm y 28 °C durante 96 h.

En tubos con tapa de rosca, tomar alícuotas de 10 mL con pipetas estériles a las 0, 24, 48, 72 y 96 h de incubación (agitar el matraz antes de cada muestreo). Guardar en congelación.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	11 / 41

II. Determinaciones a realizar:

- a) *Peso húmedo.* Tomar 5 mL del cultivo de cada muestra, colocarlo en tubos de 13 x 100 mm previamente pesado, centrifugar durante cinco minutos a 3000 rpm, retirar el sobrenadante y pesar nuevamente el tubo con sedimento. Registrar el peso de la masa celular.
- b) *Densidad óptica.* Tomar 5 mL del cultivo de cada muestra y colocarlos en tubos de 13 x 100 mm, centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm, separar el sobrenadante para la determinación de azúcares reductores por la técnica de 3,5-Dinitrosalílico (DNS).

Resuspender el sedimento con 5 mL de solución salina al 0.85% y determinar densidad óptica a 540 nm, utilizando como blanco la muestra del tiempo cero (antes de inocular).

- c) *Peso seco.* Transferir el resto de la suspensión de cada muestra a tubos de 13 x 100 mm previamente llevados a peso constante, centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos, desechar el sobrenadante y llevar el paquete celular hasta peso constante a 70 °C.
- d) *Determinación de azúcares reductores por la técnica de DNS.*

Preparación del reactivo de DNS.

Hidróxido de sodio	14.0 g
Ácido 3, 5-dinitrosalicílico	7.5 g
Tartrato de sodio y potasio	216.0 g
Fenol	5.6 g
Metabisulfito de sodio	5.9 g
Agua destilada	1.0 L



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	12 / 41

Nota: Es importante agregar los reactivos en el orden enlistado anteriormente y no añadir el siguiente sino hasta que se haya disuelto por completo el anterior. El reactivo se debe dejar reposar en frasco ámbar por lo menos 24 h antes de su uso. Guardar en refrigeración.

Técnica

En tubos de 13 x 100 mm colocar 0.5 mL del sobrenadante de cada muestra, agregar 0.5 mL de DNS, homogenizar y llevar la mezcla a baño de agua a ebullición durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo colocarlos inmediatamente en agua fría, añadir 4 mL de agua destilada y determinar la densidad óptica a 575 nm, utilizando agua destilada como blanco (hacerle todo el tratamiento).

Curva estándar de glucosa.

Solución estándar de glucosa 1 mg/mL (Preparar 100mL)

Tubo	Estándar (mL)	Agua (mL)	Concentración (mg/mL)
1	0.0	1.0	0
2	0.2	0.8	0.2
3	0.4	0.6	0.4
4	0.6	0.4	0.6
5	0.8	0.2	0.8
6	1.0	0.0	1



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	13 / 41

INFORME

Aspectos que deben ser considerados como parte de los resultados y del análisis de los mismos:

- Cinética de peso seco o peso húmedo contra tiempo,
- Cinética de azúcares reductores contra tiempo.
- Cinética de densidad óptica contra tiempo.
- ¿Cuál fuente de nitrógeno proporcionó resultados óptimos y por qué?
- ¿Cuál fuente de nitrógeno proporcionó los resultados menos óptimos y por qué?

CUESTIONARIO

- ¿Qué es un medio de cultivo, que finalidad tiene diseñarlo y con base a qué se debe diseñar?
- ¿Qué es el crecimiento microbiano?
- ¿Cuáles son las principales fuentes de carbono usadas en procesos microbiológicos industriales y cuál es su función?
- ¿Cuáles son las principales fuentes de nitrógeno usadas en procesos microbiológicos industriales y cuál es su función?
- ¿Cuál es la importancia de las sales minerales en un medio de cultivo, como se clasifican y en qué cantidades se adicionan?
- Mencione que características consideraría para diseñar un medio de cultivo para bacterias y ¿por qué?
- De manera general diseñe un medio de cultivo para hongos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	14 / 41

REFERENCIAS

1. Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. Principles of fermentation technology. 2nd ed. Great Britain: Butterworth; 1995.
2. Sánchez-Yañez JM. Biorremediación. Estrategias contra la contaminación ambiental. Argentina: Libros en red; 2013.
3. Felipe-Bravo GM, [material en línea] [consultado el 20 de junio de 2014] disponible en: <http://ucvvirtual.edu.pe/campus/HDVirtual/700426433/SEMANA%2003/7000170556/SES%C3%93N%2003%2020METABOLISMO%20Y%20CRECIMIENTO%20BACTERIANO.pdf>
4. Zuñiga–Aguilar [material en línea] [consultado el 20 de junio de 2014] disponible en : <http://www.itescam.edu.mx/principal/syllabus/fpdb/recursos/r90277.PDF>
5. [Documento en línea] [consultado el 20 de junio de 2014] disponible en: http://www.science.oas.org/Simbio/mbio_ind/cap4_mi.pdf.
6. Romero CR. Microbiología y parasitología humana. 3a ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2007.
7. Pomerville J.C. Alcamo's fundamentals of microbiology. 8th ed. USA: Jones and Bartlett Publisheas; 2007.
8. Sharma DK. Microbiology. India: Alpha Science; 2013.
9. Lewan JY, Bauix M. Los microorganismos de interés industrial. Zaragoza, España: Acribia; 2005.
10. Demain AL, Davies JE. Manual of industrial microbiology and biotechnology. 2th ed. Washington, D.C.: ASM Press; 1999.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	15 / 41

PRÁCTICA 2. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

INTRODUCCIÓN

El éxito o fracaso de un proceso fermentativo comienza con el microorganismo utilizado, la etapa de aislamiento de microorganismos, es la primera fase del proceso. Una de las tareas de la microbiología industrial es desarrollar procedimientos que permitan el aislamiento y selección de microorganismos de interés industrial, su éxito depende de la fuente utilizada para la obtención del microorganismo y del método elegido.

Los microorganismos que se utilizan en una fermentación pueden ser obtenidos por aislamiento a partir de fuentes naturales o de una colección de cultivos. El aislamiento de un microorganismo a partir de fuentes naturales se realiza mediante screening (búsqueda) que implica la detección y aislamiento de microorganismos de interés industrial de entre una población compleja de organismos utilizando procedimientos selectivos.

El screening generalmente parte de una población, mixta donde existe tanto una gran cantidad como variedad de microorganismos potencialmente útiles que deben ser seleccionados; para ello lo primero que se hace es utilizar medios selectivos donde crezca el microorganismo de interés, a este medio se le puede adicionar inhibidores para eliminar microorganismos que no nos interesan. Durante esta etapa es importante considerar parámetros generales como la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, agitación, temperatura, pH e inhibidores.

Para que un cultivo microbiano aislado pueda usarse en un proceso fermentativo industrial es necesario que cumpla con las siguientes características generales: debe ser genéticamente estable, producir células vegetativas, esporas u otras unidades reproductivas, crecer vigorosa y rápidamente después de la inoculación dentro de los tanques con el medio semilla empleado para preparar grandes cantidades de inóculo, debe ser un cultivo puro, producir el producto requerido en periodos cortos de tiempo, obtener el producto deseado y la exclusión de sustancias tóxicas, poseer mecanismos de defensa contra la contaminación, crecer rápidamente por periodos largos de tiempo en medios de cultivo de mantenimiento, ser resistente a cambios por ciertos mutágenos y debe dar un



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	16 / 41

monto predecible del producto deseado en un determinado tiempo de fermentación.

La selección y el mejoramiento continuos de nuevas cepas acondicionadas al medio ambiente natural, es recomendable aún dentro de un proceso fermentativo integrado, por lo que es indispensable conocer las técnicas de aislamiento y selección de microorganismos de interés industrial. Dos de los microorganismos de gran interés en la producción de ácido cítrico a nivel industrial son *A. niger* (figura 2.1) y *Penicillium* (figura 2.2).

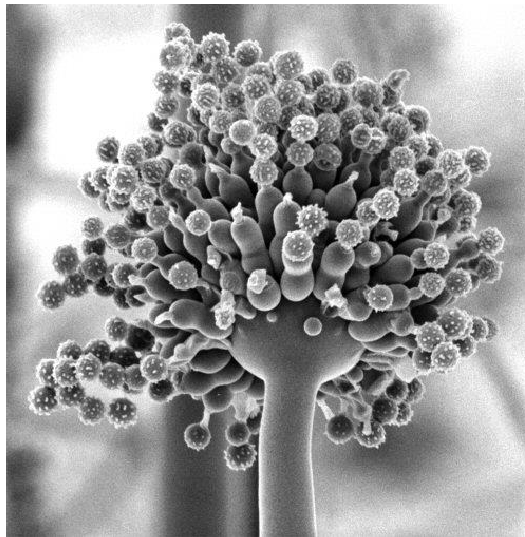


Figura 2.1. Aspecto microscópico de *Aspergillus niger*. Tomado de imagen en línea: Microbiología de los alimentos. 2009. Thomas J. Montville, Karl R. Matthews



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	17 / 41

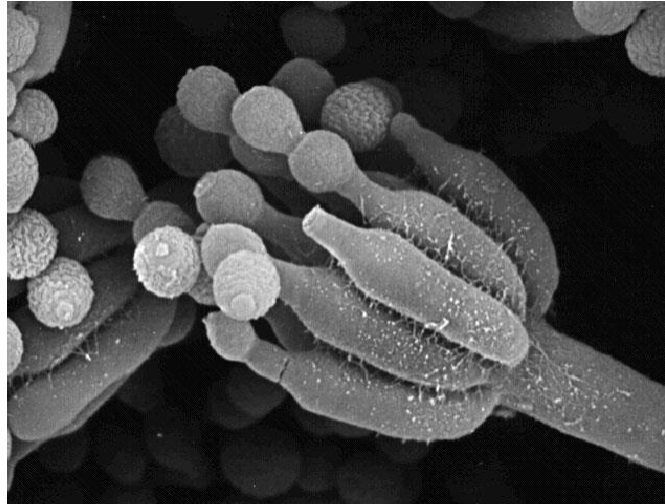


Figura 2.2. Aspecto microscópico de *Penicillium sp.* Tomado de: imagen en línea: Fungi and food spoilage. John I. Pitt, Ailsa Diane Hocking John Ingram Pitt, Diane Ailsa Hocking.

OBJETIVOS

Aislar hongos a partir de muestras de suelo o de frutas contaminadas usando las técnicas de dilución y extendido en placa.

De los hongos aislados seleccionar los más adecuados con base a la cantidad producida de ácidos orgánicos.

MATERIAL

I. Material

- Cajas de Petri
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL
- Tubos de ensaye con agua o solución salina estéril
- Asa bacteriológica
- Matraces Erlenmeyer de 500 y 1000 mL
- Agujas de disección



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	18 / 41

Microorganismos

Aspergillus niger

MEDIOS DE CULTIVO

Medio Martin

Glucosa	10.00 g
Peptona	5.0 g
Fosfato de potasio monobásico	1.0 g
Sulfato de magnesio	0.50 g
Rosa de bengala	0.05 g
Estreptomicina*	30 µg/mL
Agar bacteriológico	15.00 g
Agua destilada	1.0 L

Ajustar el pH a 6.0.

Esterilizar a 15 libras de presión durante 15 minutos.

NOTA:

* La estreptomicina se adiciona al medio estéril en condiciones asépticas.

Medio Foster

Glucosa	50.0 g
Peptona	5.0 g
Fosfato de potasio monobásico	1.0 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Agar bacteriológico	20.0 g
Indicador**	67.0 mL
Agua destilada	1.0 L

Ajustar el pH A 6.0.

Esterilizar a 15 libras de presión durante 15 minutos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	19 / 41

NOTA:

** Solución de indicador: Pese un gramo de verde de bromocresol, disuelva en 14 mL de NaOH 1 N y afore a 250 mL.

MÉTODO

I. Aislamiento

Con una espátula tome una muestra de suelo o fruta contaminada y colóquela en un tubo de ensaye con 5 mL de solución salina estéril; de ésta muestra haga diluciones hasta 10^{-5} . De las dos últimas diluciones de cada muestra tome una alícuota de 0.5 mL y colóquela en las cajas de Petri con medio de Martin ya solidificado, extienda uniformemente en la superficie de éste e incube a 29 °C.

A partir del tercer día de incubación observe las cajas cada 24 h hasta la aparición de crecimiento característico de *A. niger*.

Una vez obtenido éste, saque las cajas de la incubadora y guárdelas en refrigeración.

De las cajas con medio de Martin que hayan mostrado crecimiento de hongos, de preferencia del género *Aspergillus*, realizar un frote y teñirlo con azul de algodón lactofenol. Con el asa recta tome una porción de la colonia e inocule por punción en el centro de una caja con medio de Foster. Incube a 29 °C y observe el crecimiento.

Si no se obtiene crecimiento característico del género *Aspergillus* se le proporcionará una cepa para continuar con el proceso.

En el medio de Foster seleccione aquellas colonias que presenten un halo amarillo alrededor de la colonia, el cual indica la producción de ácido en el medio.

Tinción con azul de algodón

Colocar una gota de azul de algodón en el centro de un portaobjetos; tomar una pequeña porción del cultivo con un asa estéril y colocarla sobre la gota del colorante, extendiendo la preparación cuidadosamente con un par de agujas de disección y cubrir con un cubreobjetos. Observar al microscopio con menor y mayor aumento (objetivos 10x y 40x).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	20 / 41

Preparación de azul de algodón

Fenol	20.0 mL
Ácido láctico concentrado	20.0 mL
Glicerol (glicerina)	40.0 mL
Azul de algodón (azul de anilina)	0.05 g
Agua destilada	20.0 mL

Fundir los cristales de fenol en un baño de agua caliente. A 20 mL de fenol fundido agregar las otras sustancias. Mezclar suavemente con una varilla de vidrio, pasar por papel filtro y conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

II. Determinaciones a realizar:

- a) *Describir las características macroscópicas y microscópicas de los hongos aislados.*
- b) *Medir el diámetro de los halos amarillos en el medio de Foster.*

INFORME

Aspectos que deben ser considerados como parte de los resultados y del análisis de los mismos.

- a) Ventajas del uso de la técnica de diluciones y del empleo de antibióticos como estrategias de aislamiento de microorganismos.
- b) Características macroscópicas de los microorganismos observados.
- c) Comparación de las cepas aisladas con las cepas de referencia.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	21 / 41

CUESTIONARIO

1. Mencione los principales microorganismos productores de ácido cítrico.
2. Indique las características macro y microscópicas de *A. niger* y del género *Penicillium*.
3. Explique cada una de las características que debe tener un microorganismo para utilizarse en un proceso fermentativo industrial.
4. Mencione las fuentes de obtención de microorganismos para procesos fermentativos industriales.
5. Indique que es una colección de cultivo y mencione los nombres de 5 colecciones de cultivos microbianos.
6. Explique en qué consiste el screening primario y el screening secundario.
7. Describa las principales técnicas de aislamiento y selección de microorganismos de la naturaleza.
8. ¿Cuál es la función del verde de bromocresol y rosa de bengala?

REFERENCIAS

1. Hesseltine CW, Haynes WC. Sources and management of micro-organisms for the development of a fermentation industry. En: Thoma WR editor. Industrial microbiology. Pennsylvania: Dowden, Hutchinson & Ross, Inc.; 1977. Vol: 12 p. 22-48.
2. Demain AL, Davies JE. Manual of industrial microbiology and biotechnology. 2n. ed. Washington, D.C.: ASM Press; 1999.
3. Mateos GPF. Aislamientos y selección de microorganismos industriales. [Material en línea] [consultado el 24 de abril de 2014] disponible en: <http://Darwin.usal.es/profesores/pfmg/MItema03MI.html>
4. Selección, mantenimiento y mejoramiento de microorganismos de interés industrial. [Material en línea] [consultado el 15 de abril de 2014] disponible en: www.science.oas.org/simbio/mbio_ind/cap3_mi.pdf
5. Ruiz SJ. Problemas de laboratorio químico y farmacéutico. Técnicas analíticas con formulación magistral. 2a ed. México: Elsevier; 2009.
6. Mier T, Toriello C, Ulloa M. Hongos microscópicos saprobios parásitos: métodos de laboratorio. México: Universidad Autónoma Metropolitana; 2002.
7. Smith G. Introducción a la microbiología industrial. Editorial Acriba. 1963



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	22 / 41

PRÁCTICA 3. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO

INTRODUCCIÓN

La producción de ácido cítrico se realizó primero en Italia a partir de jugo de limón en 1860 con bajo rendimiento, ya que eran necesarias 35 toneladas del fruto para obtener una tonelada del ácido. La producción a partir de sacarosa fue descubierta en 1893 por C. Wehmer en cultivos de *Penicillium*, y su producción industrial alcanzó importancia hasta la Primera Guerra Mundial cuando Italia deja de exportar limones. El químico James Currie y Claudio Colán descubrieron en 1917, que cultivos de *A. niger* eran eficientes productores del mismo y dos años después Pfizer usando esta técnica comenzó la producción a escala industrial.

El ácido cítrico es un metabolito intermediario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Figura 3.1) y es excretado como un producto del metabolismo primario por cepas de hongos y levaduras como: *A. niger*, *A. wentii*, *A. clavatus*, *P. luteum*, *P. citrinum*, *Mucor piriformis*, *Paelomyces divaricatum*, *Candida guilliermondii*, *Saccharomyopsis lipolytica* y *Trichoderma viridae*.

Actualmente casi todo el ácido cítrico que se produce industrialmente se obtiene en fermentadores por cepas mutantes de *A. niger*, mismas que comparadas con las de *Penicillium* son mejores productoras por unidad de tiempo y en ellas puede suprimirse más fácilmente la formación de los ácidos oxálico, isocítrico y glucónico que son productos laterales no deseados. La producción mundial es de 550,000 toneladas/año y lo producen principalmente U.S.A., la Unión Europea y China.

Su sabor agradable y toxicidad baja y otras propiedades fisicoquímicas han favorecido su uso en la industria alimentaria como conservador, antioxidante, acidulante, saborizante de golosinas, bebidas gaseosas y otros alimentos. En la industria farmacéutica como saborizante, efervescente y anticoagulante. En detergentes y productos de limpieza para estabilizarlos y otorgarles acidez y para reemplazar corrosivos más fuertes. Otros usos son: imprenta textil, agente abrillantador de metales, en cosméticos y artículos de tocador (productos para el cuidado del cabello, perfumes, cremas, lociones, desodorantes, quitaesmalte y jabones).

El ácido cítrico puede producirse industrialmente en cultivo superficial y sumergido, mientras que en el primero el proceso puede durar de 6 a 8 días, en el segundo es más tardado hasta por 15 días. Los sustratos que funcionan como fuente de carbono incluyen una amplia variedad como: almidón de papa, hidrolizados de almidón, jarabe glucosa de almidón, jarabe de caña de azúcar,



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	23 / 41

sacarosa, melazas de caña y de remolacha. La fuente de nitrógeno más utilizada es el NH_4NO_3 y son indispensables sales como KH_2PO_4 y MgSO_4 para su desarrollo. Las condiciones de fermentación son: pH 2.8-3.5, temperatura 28-33 °C. La aireación es indispensable, ya que, al ser un proceso de oxidación, el oxígeno no debe faltar.

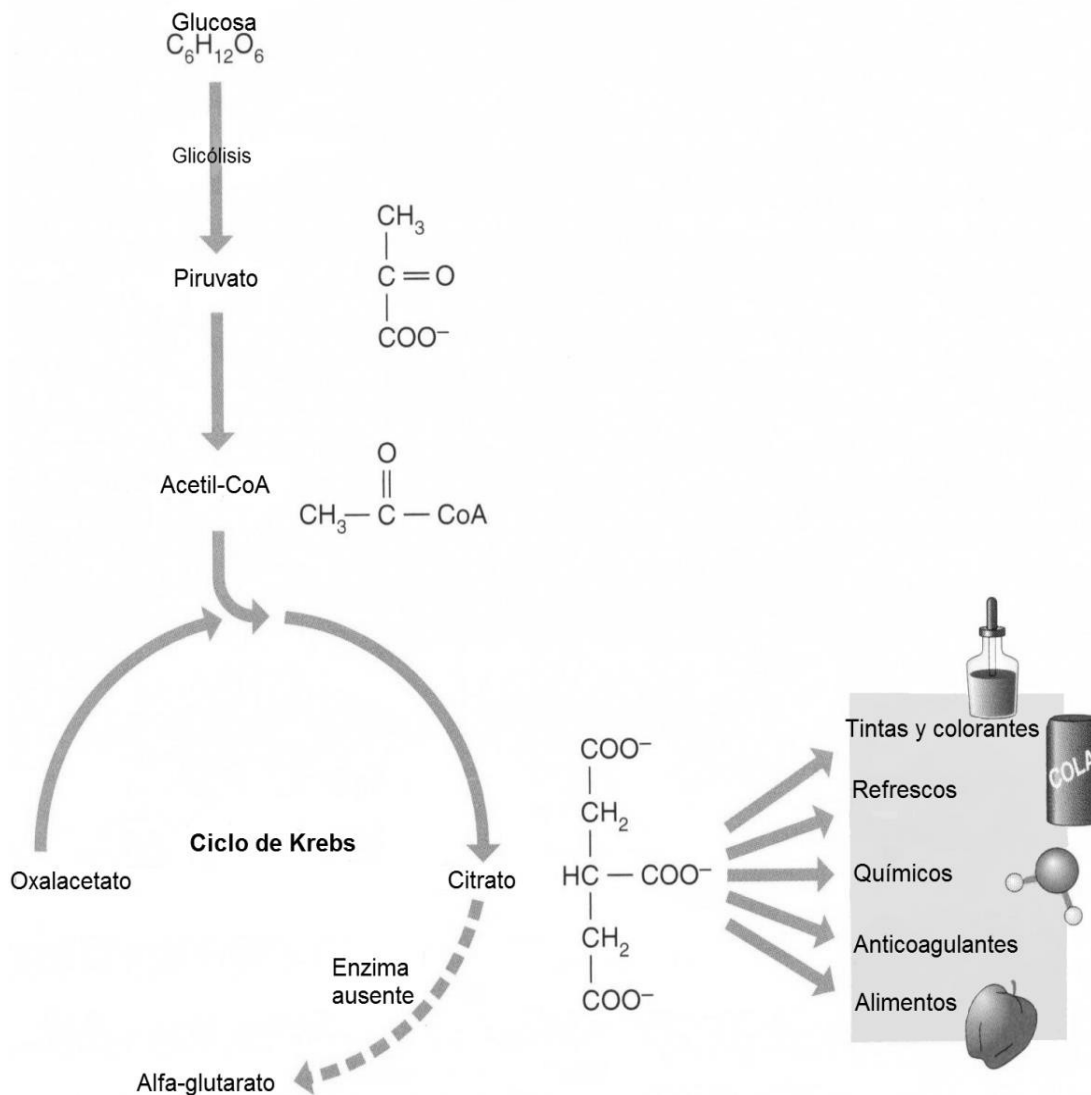


Figura 3.1. Química de la producción de ácido cítrico. Modificado de Pomerville JC., 1997.

OBJETIVO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	24 / 41

Producción e identificación del ácido cítrico con las cepas aisladas previamente, comparándola con una cepa de colección de *Aspergillus niger*.

MATERIAL

- Matraz Erlenmeyer de 500 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Pipetas estériles de 10 mL despuntadas
- Tubos de ensaye de 18 x 150 mm con tapa de rosca
- Tubos de ensaye de 18 x 150 mm
- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm con solución salina estéril
- Tubos inclinados con medio de agar Sabouraud o agar papa dextrosa
- Bureta graduada
- Soporte Universal
- Papel filtro Whatman # 1
- Tubos capilares
- Cámara de elución

REACTIVOS

- Acetato de butilo
- Ácido acético
- Ácido cítrico
- Ácido oxálico
- Azul de bromofenol

Microrganismos

Cepas aisladas en la práctica anterior

Aspergillus niger de referencia



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	25 / 41

MEDIOS DE CULTIVO

Medio de producción

Glucosa	50.00 g
Fosfato de potasio monobásico	2.50 g
Sulfato de magnesio	0.25 g
Nitrato de amonio	2.50 g
Agua destilada	1.0 L

Ajustar el pH a 3.0

Esterilizar a 15 libras de presión durante 15 minutos.

MÉTODO

I. Producción de ácido cítrico

De las cajas de medio Foster, una vez seleccionada una colonia representativa, tome una asada e inocule un tubo con medio inclinado de agar papa dextrosa (PDA). Incube durante tres o cuatro días a 29 °C para esporulación. Siga el mismo procedimiento para la cepa de *Aspergillus niger* de referencia. Una vez esporulados los cultivos, agregue en condiciones asépticas 5 mL de medio de producción y haga una suspensión de esporas con la que se inoculará el matraz con 200 mL de medio de producción. Incube los matraces inoculados a 29 °C y 200 rpm por 168 h, tome una muestra de 10 mL cada 24 h y guárdelas en congelación para su análisis posterior.

II. Determinaciones a realizar:

a) *Cambio de pH.* Medición con tiras de papel indicador.

b) *Acidez total.* Tome una alícuota de 5 mL y centrifugue a 3000 rpm. Coloque 2 mL del sobrenadante en un matraz Erlenmeyer de 100 mL y titule con NaOH valorado 0.1 N, utilizando fenolftaleína como indicador (al 1 % en etanol). (Valore el NaOH con biftalato de sodio).

c) *Determinación de azúcares reductores por el método de DNS.* (Ver la técnica en la práctica 1).

d) *Identificación de ácido cítrico producido por cromatografía en papel.*



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	26 / 41

Preparación de soluciones

- a) Preparación del eluyente
Acetato de butilo-ácido acético (2:1)
- b) Preparación del revelador
Azul de bromofenol en etanol al 96 % en concentración de 1 g/L.
- c) Preparación de soluciones estándar de ácidos orgánicos
Prepare soluciones estándar de ácido cítrico, ácido oxálico, ácido succínico en concentración de 5 mg/mL.

Técnica

Corte el papel filtro Whatman # 1, de tal forma que quede un rectángulo de 9 x 10.5 aproximadamente. Trace con un lápiz una línea de un cm en la parte inferior del papel y marque 8 cruces distribuidas sobre la misma. Prepare 4 tubos capilares para la aplicación de las muestras en el papel filtro.

Aplique con las capilares soluciones estándar de los ácidos orgánicos y las muestras problemas sobre la parte posterior de las cruces en el papel filtro. Sólo es necesario que la punta del capilar toque por breves instantes la superficie de la fase estacionaria. Deje secar y repita esta operación 5 veces.

Coloque el eluyente (acetato de butilo-ácido acético 2:1) en la cámara de elución considerando que el nivel máximo debe quedar por debajo de la línea de aplicación de la muestra en el papel filtro.

Introduzca cuidadosamente el papel filtro en la cámara de elución y tápelo con una bolsa de plástico transparente para permitir el equilibrio líquido-vapor del eluyente.

Espere a que el frente del eluyente avance hasta un cm antes del fin de la fase estacionaria del papel filtro y retire esta última. Deje secar a temperatura ambiente y aplique revelador (azul de bromofenol) con un aspersor de manera que cubra toda la superficie del papel filtro. Espere a que aparezcan las manchas. Mida las distancias recorridas para cada una de las muestras aplicadas y del eluyente.

Calcule el Rf de cada una de las manchas obtenidas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	27 / 41

INFORME

Aspectos que deben ser considerados como parte de los resultados y del análisis de los mismos.

- a) Curva estándar de glucosa.
- b) Cinética de azúcares reductores.
- c) Cinética de pH.
- d) Porcentaje de acidez total.
- e) Resultados obtenidos en la cromatografía en papel.
- f) Calculo del Rf de las muestras.

CUESTIONARIO

1. Mencione los usos del ácido cítrico en la industria alimentaria y farmacéutica.
2. ¿Qué factores y porqué es importante controlarlos durante la producción de ácido cítrico por vía fermentativa?
3. Elabore un cuadro comparativo sobre cuáles son las ventajas y desventajas de producir ácido cítrico por vía microbiana, síntesis química y a partir de cítricos.
4. Elabore un diagrama de la secuencia del proceso de recuperación del ácido cítrico del caldo de fermentación.
5. Describa paso a paso la ruta biosintética para la producción de ácido cítrico a partir de glucosa.
6. ¿Cuáles son los principales sustratos utilizados a nivel industrial para la producción de ácido cítrico?
7. Investiga los tipos de sistemas de fermentación que se utilizan para producir el ácido cítrico a nivel industrial.
8. ¿Cuáles son los métodos para identificar la producción del ácido cítrico por vía microbiana?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	28 / 41

REFERENCIAS

1. Bu'lock J, Kristiansen Bjorn. Biotecnología básica. España. Editorial Acribia, S.A., 1991.
2. Pepler HJ, Perlman D, editors. Microbial technology. Fermentation technology. 2a ed. USA: Academic Press Inc.; Vol I 1979.
3. Demain AL, Davies JE. Manual of industrial microbiology and biotechnology. 2a ed. Washington, D.C.: ASM Press; 1999.
4. Instituto Politécnico Nacional. Manual de Laboratorio de Biotecnología microbiana y Microbiología industrial. México: 2012.
5. Crueger W, Crueger A. Biotecnología: Manual de microbiología industrial. España: Editorial Acribia S. A.; 1989.
6. Rosas EP, Producción de ácido cítrico por hongos. [material en línea] [consultado el 20 de junio de 2014] disponible en : <http://poltaco.blogspot.mx/2009/08/produccion-de-acido-citrico-por-hongos.html>
7. Blog. Producción de ácido cítrico. [material en línea] [consultado el 20 de junio de 2014] disponible en: <http://miaproduccionacidocitricos.blogspot.mx>
8. Ácido cítrico. [material en línea] [consultado el 20 de septiembre de 2014] disponible en: www.ecured.cu/index.php/Ácidocítrico
9. Staff técnico de IQUIMICAS. Proceso de producción industrial de ácido cítrico. [material en línea] [consultado el 20 de septiembre de 2014] disponible en: <http://iquimicas.com/proceso-de-produccion-industrial-de-acido-citrico/>
10. Jeffrey C. Alcamo's fundamentals microbiology. 8th ed. USA: Pomerville; 2007.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	29 / 41

PRÁCTICA 4. CRECIMIENTO MICROBIANO

INTRODUCCIÓN

El crecimiento microbiano es el aumento ordenado de los componentes celulares dando como resultado el incremento en el número de individuos a lo largo del tiempo y como consecuencia de la población. Para que este crecimiento se de en condiciones óptimas es necesario tener el control y la optimización de los nutrientes y de las condiciones fisicoquímicas. Las células aisladas y cultivadas en un medio de cultivo apropiado van utilizando los nutrientes y sintetizando moléculas necesarias para el mantenimiento y la reproducción de las mismas.

Utilizando un método para medir el crecimiento microbiano es posible obtener una cinética de crecimiento de los cultivos microbianos necesaria para predecir la evolución de un cultivo y cómo es la relación entre consumo del sustrato y la formación de los productos. Conociendo estos datos es posible calcular parámetros como el coeficiente de rendimiento del sustrato (Y_x/s) o del producto (Y_p/s), el tiempo de duplicación (t_d), la velocidad específica de crecimiento (μ) y la productividad, esta información permitirá desarrollar el cultivo a mayores escalas. Los sistemas de cultivo se realizan básicamente por cultivo en lote (batch) o en continuo el primero una vez inoculado el medio, la concentración de biomasa aumenta a expensas de los nutrientes y cuando el sustrato se agota el crecimiento se limita. A diferencia el cultivo continuo, se alimenta continuamente con medio fresco que contiene un sustrato limitante y por otro lado sale medio parcialmente agotado, células y algún producto, de tal forma que el volumen del biorreactor no varía.

En un cultivo en lote se presentan cuatro fases características del crecimiento microbiano: la fase de latencia (lag), la exponencial (log), la estacionaria y la de muerte. Es recomendable en los procesos a nivel industrial que la fase de latencia dure lo menos posible ya que implica un ahorro en el tiempo de producción.

Una de las formas de acortar esta fase es aumentando el tamaño de inóculo, es por esto que en esta práctica se inocularán los medios de cultivo con diferentes porcentajes de inóculo y se tomarán muestras cada hora para obtener datos suficientes para construir una curva de crecimiento microbiana y calcular algunos parámetros cinéticos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	30 / 41

OBJETIVOS

Construir experimentalmente una curva de crecimiento microbiano mediante el monitoreo de su crecimiento.

Evaluar el crecimiento microbiano, mediante el análisis de datos, de un proceso típico de fermentación.

MATERIAL

- Incubadora con agitación y temperatura controladas
- Tubos con agar PDA inclinados y sembrados con *Candida utilis*
- Matraces Erlenmeyer de 500 mL de medio líquido de producción
- Pipetas estériles
- Tubos de 13x100 mm a peso constante

Microorganismo

Candida utilis

MEDIOS DE CULTIVO

Medio de producción

Glucosa	10.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Peptona	5.0 g
Agua destilada	1.0 L

Ajustar el pH a 5.2.

Esterilizar a 12 lb de presión durante 15 minutos.

MÉTODO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	31 / 41

I. Crecimiento

Prepare 3 matraces Erlenmeyer de 500 mL, con 200 mL de medio de cultivo e inocule uno de ellos con 4 mL (2% de inóculo), otro con 5 mL (2.5% de inóculo) y el tercero con 6 mL (3.0% de inóculo), de un cultivo de *Candida utilis* de 24 h de crecimiento e incube en agitación a 200 rpm y 29 °C durante un periodo de 16 a 18 h. En condiciones asépticas tome 10 mL de muestra cada hora durante 12 h y guarde en congelación.

II. Determinaciones a realizar:

- Peso húmedo.* (Ver la técnica en la práctica 1).
- Densidad óptica.* (Ver la técnica en la práctica 1).
- Determinación de azúcares reductores por el método DNS.* (Ver la técnica en la práctica 1).

INFORME

Aspectos que deben ser considerados como parte de los resultados y del análisis de los mismos.

- Cálculo de velocidad específica de crecimiento ($\mu = h^{-1}$)
- Cálculo del tiempo de duplicación ($t_d = h$)
- Cálculo de rendimiento celular ($x = g$ de células/L)
- Cálculo del coeficiente de rendimiento de sustrato ($Y_{x/s} = g$ de células formadas/g de sustrato degradado)
- Cálculo de productividad ($P = x/t = g$ de células /L/h)
- Cinética de peso húmedo contra tiempo
- Cinética de azúcares reductores
- Cinética de crecimiento microbiano



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	32 / 41

CUESTIONARIO

1. ¿Qué factores fisicoquímicos son necesarios controlar y como afectan el crecimiento microbiano?
2. Explique qué ocurre fisiológicamente en cada etapa de la curva de crecimiento.
3. ¿Cómo varía el contenido de macromoléculas en cada fase del crecimiento?
4. ¿Por qué se presenta la fase de latencia y cómo se calcula gráficamente?
5. Explique cómo se disminuye la fase de latencia.
6. ¿Qué es el tiempo de duplicación y cómo se calcula?
7. Explique qué es el cultivo continuo y en cuál fase de la curva de crecimiento se establece.
8. Explique qué es un cultivo en lote.
9. Explique ¿cuáles son las características macroscópicas y microscópicas de *Candida utilis*?
10. Investigue los usos de *Candida utilis*.
11. Realice el esquema de un fermentador o biorreactor, sus componentes y aditamentos principales.

REFERENCIAS

1. Wang D, Cooney ChL, Demain AL, Dunnill P, Humphrey AE, Lilly MD. Fermentation and enzyme technology. U.S.A.: Jhon Wiley and Sons; 1979.
2. Blanch HW, Clarck DS. Biochemical engineering. U.S.A.: Marcel Dekker. Inc., 1997.
3. Demain AL, Davies JE. Manual of industrial microbiology and biotechnology. 2a ed. Washington, D.C.: ASM Press; 1999.
4. Pomerville J.C. Alcamo's fundamentals of microbiology. 8th ed. USA: Jones and Bartlett Publisheas; 2007.
5. Sharma DK. Microbiology. India: Alpha Science; 2013.
6. Crueger W, Crueger A. Biotecnología. Manual de microbiología industrial. España: Editorial Acribia S. A; 1989.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	33 / 41

PRÁCTICA 5. PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS POR MICROORGANISMOS

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos como la penicilina y otros compuestos como las micotoxinas y vitaminas, forman parte de un grupo de compuestos denominados metabolitos secundarios, se forman durante la fase estacionaria de crecimiento, que ocurre cuando el crecimiento se desbalancea o se limita por falta de uno o más nutrientes, la velocidad de crecimiento decrece y la producción de este tipo de compuestos aumenta.

El descubrimiento del primer antibiótico lo realizó en 1928 Alexander Fleming, significó un importante paso en Medicina, ya que trajo consigo un cambio en el tratamiento de las enfermedades, actualmente más de 100 antibióticos se usan como agentes quimioterapéuticos.

El término antibiótico fue acuñado por Selman Waskman, sin embargo antibiótico es estrictamente definido como la sustancia química producida por microorganismos, actualmente la mayoría de los antibióticos son semisintéticos (sustancias obtenidas modificando químicamente una sustancia obtenida de microorganismos), además otros son producidos puramente de forma sintética. Son generados por algunas cepas de especies, como ciertos hongos y bacterias, el máximo número de antibióticos han sido obtenidos del género *Streptomyces*; una elevada proporción de antibióticos, en especial las penicilinas se usan en Medicina ya que posee actividad antimicrobiana.

Los primeros procesos para la producción de penicilina, que fue el primer antibiótico conocido implicaba el crecimiento de *Penicillium notatum* sobre la superficie de un medio líquido (Czapeck-Dox-glucosa). El período de incubación era usualmente de 6-12 días y posteriormente la penicilina se extraía con solventes previa separación del micelio.

A lo largo de la historia se han realizado innovaciones que comenzaron en 1945 con el descubrimiento de una nueva especie, *P. chrysogenum*, con el incremento de los rendimientos de producto, el uso del cultivo sumergido empleando lactosa como fuente de carbono y energía y agua de macerado de maíz como fuente de nitrógeno. Además, a ésta época corresponde el hallazgo del uso de precursores como el fenilacetato que permitieron el incremento en los rendimientos del antibiótico y la producción predominantemente de penicilina G.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	34 / 41

En la producción de penicilina como en la de otros productos biotecnológicos, predomina la competencia entre los grandes laboratorios productores que realizan esfuerzos permanentes para mejorar en cada área de proceso: cepa, fermentación y separación. Su producción se realiza por la técnica convencional conocida como fermentación en medio líquido, que consiste en inocular primero un medio específico (semilla) para el crecimiento del hongo, cuando se obtiene una buena cantidad de biomasa, se transfiere a un tanque de fermentación que contiene medio diseñado específicamente para la producción, en este fermentador se controlan parámetros como pH, temperatura, agitación, tiempo de producción, volumen celular, concentración de azúcares residuales, etc. Posteriormente se separa el micelio por filtración, se extrae el antibiótico del caldo de fermentación, seguido de la cristalización o precipitación ácida del mismo.

Biosíntesis

El anillo de la penicilina (anillo β lactámico-tiazolidina) se produce por medio de un dipéptido compuesto de ácido L- α -aminodipídico (L- α -AAA) y L-cisteína. Subsecuentemente se conecta la L-valina, mediante una reacción de epimerización, dando lugar a la formación del tripéptido δ -(L- α -aminodipidil)-L-cisteinil-D-valina. El primer producto de la ciclación del tripéptido que puede ser aislado es la isopenicilina N pero no se conocen las reacciones bioquímicas que conducen a este intermediario; el segundo producto es el ácido 6 aminopenicilánico (6APA), el cual no es un producto intermediario de biosíntesis, se excreta en ausencia de un precursor de la cadena lateral. La bencilpenicilina se produce en el intercambio de L- α -AAA (L- α -aminodipídico) con ácido fenilacético activado (Figura 5.1).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	35 / 41

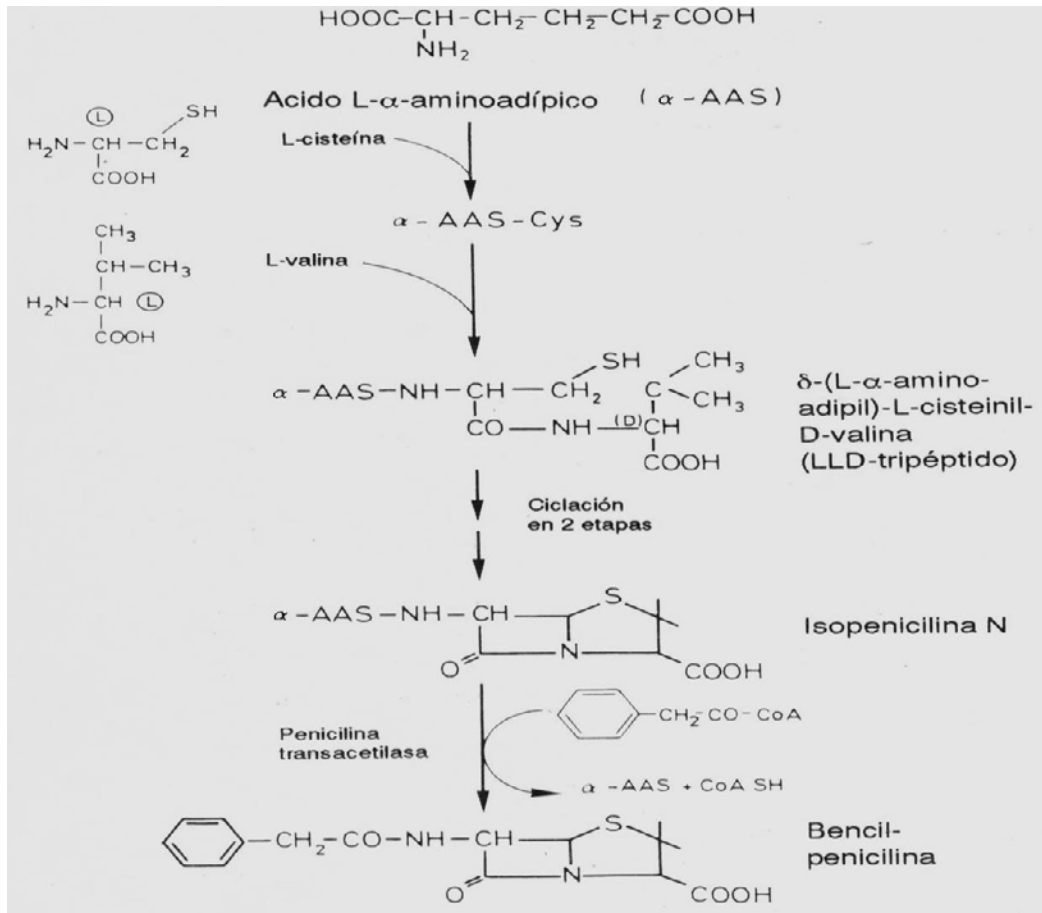


Fig
ura

5.1. Biosíntesis de penicilina en *Penicillium chrysogenum*.
Fuente: Crueger W, Crueger A, 1989.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	36 / 41

OBJETIVOS

Producción de penicilina por vía microbiana con diferentes cepas de *P. chrysogenum*.

Determinar la potencia del antibiótico producido, comparándolo con uno comercial utilizando un método de difusión.

MATERIAL

- Matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio semilla
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de medio de producción
- Tubos de ensaye de 18 x 150 mm con tapa de rosca
- Pipetas estériles de 10 mL
- Incubadora con agitación y temperatura controladas
- Caja de acrílico de 30 x 30 cm
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Oradador

Microorganismos

Penicillium chrysogenum

Bacillus subtilis

MEDIOS DE CULTIVO

Caldo soya tripticaseína (para crecimiento de *Bacillus subtilis*)

Cloruro de sodio	5.0 g
Dextrosa	2.5 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Peptona de caseína	17.0 g
Peptona de soya	3.0 g

Ajustar a pH 7.3 ± 0.2 .

Esterilizar a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	37 / 41

Medio semilla de composición compleja (Somerson y col., 1961)

Glucosa	20.0 g
Carbonato de calcio	5.0 g
Licor de maíz	20.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Agua destilada	1.0 L

Ajustar el pH a 6.0-6.5.

Esterilizar a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

Medio complejo de producción (Somerson y col., 1961)

Lactosa	55.0 g
Licor de maíz	35.0 g
Carbonato de calcio	10.0 g
Sulfato de magnesio	3.0 g
Fosfato de potasio monobásico	7.0 g
Aceite de soya o aceite de maíz	2.5 g
Ácido fenilacético al 20% en etanol	2.5 mL
Agua destilada	1.0 L

Ajustar el pH a 6.8.

Esterilizar a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

Amortiguador de fosfatos

Fosfato monobásico de potasio	6.40 g
Fosfato dibásico de potasio	0.25 g
Agua destilada	1.0 L

Ajustar el pH a 5.5.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	38 / 41

MÉTODO

I. Crecimiento y producción

Prepare un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio semilla e inocule con una suspensión de esporas de un cultivo de *Penicillium chrysogenum* en tubo con agar PDA inclinado, incube en agitación a 200 rpm a 25 °C durante 48 h.

Prepare un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de medio de producción e inocule con 10 mL de medio semilla con crecimiento. Incube con agitación a 200 rpm a 25 °C durante 168 h. Tome 10 mL de la muestra antes y después de inocular y cada 24 h, colóquelas en tubos con tapa de rosca y guarde en congelación

II. Determinaciones a realizar:

- Peso húmedo* (Ver técnica en la práctica 1).
- Determinación de azúcares reductores por el método de DNS* (Ver técnica en la práctica 1).
- Bioensayo*. Prepare un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio para crecimiento de *Bacillus subtilis*, esterilice e inocule con este microorganismo. Incube con agitación a 200 rpm y 37 °C durante 24 h.
Prepare 350 mL de caldo soya tripticaseína y agregue agar bacteriológico necesario para que su concentración final sea al 1% y esterilice durante 15 minutos a 15 libras de presión, enfríe a 45 °C e inocule con 0.6 mL del cultivo de *Bacillus subtilis*.
Previamente, lave y desinfecte con metanol una caja de acrílico de 30 x 30 cm, vacíe el agar soya inoculado con *Bacillus subtilis* y deje solidificar el medio. Con un horador haga pozos de 8 mm de diámetro e identifíquelos (con una marca en el reverso de la caja) y coloque 50 µL de muestra o solución patrón de penicilina (utilice solución amortiguadora de fosfatos para diluir). Ponga cuidadosamente la placa en refrigeración durante 30 minutos, e incube a 35 °C de 24 a 48 h y mida los halos de inhibición.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	39 / 41

Curva patrón de penicilina

Prepare una solución patrón de penicilina de 10 µg/mL, considerar que 1 UI equivale a 0.6 µg/mL.

A partir de la solución patrón realice las siguientes soluciones:

Solución patrón	Amortiguador de fosfatos	Concentración
1.0 mL	0.0 mL	10.0 µg/mL
0.8 mL	0.2 mL	8.0 µg/mL
0.6 mL	0.4 mL	6.0 µg/mL
0.4 mL	0.6 mL	4.0 µg/mL
0.2 mL	0.8 mL	2.0 µg/mL
0.1 mL	0.9 mL	1.0 µg/mL

Mida los diámetros de los halos de inhibición y grafique en papel semilogarítmico contra la concentración para obtener una curva patrón. Los halos de las muestras se miden de la misma manera y el resultado se extrapola en la curva patrón para determinar la concentración de las mismas.

INFORME

Aspectos que deben ser considerados como parte de los resultados y del análisis de los mismos.

- Cinética de crecimiento (g de peso seco o húmedo contra tiempo).
- Cinética de consumo de azúcares reductores (concentración de azúcares reductores contra tiempo).
- Cinética de producción de penicilina (concentración de penicilina contra tiempo).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	40 / 41

CUESTIONARIO

1. Defina el término antibiótico.
2. Mencione los principales antibióticos naturales de interés comercial y los microorganismos que los producen.
3. Defina precursor, qué función tienen en la biosíntesis y mencione dos ejemplos.
4. Describa la estructura química de las penicilinas naturales.
5. ¿Cuáles son los problemas involucrados en la producción de antibióticos a nivel industrial?
6. A qué nivel inhiben las penicilinas y cuáles son los microorganismos que son más sensibles a ellas.
7. Describa los métodos de medición de actividad antimicrobiana.
8. ¿Cuáles son las fuentes de carbono que se utilizan en la producción de penicilinas naturales?
9. Describa la composición del agua de macerado de maíz y qué importancia tiene su uso en la biosíntesis de las penicilinas naturales.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML22	24/06/2019	1	41 / 41

REFERENCIAS

1. Quintero RR. Ingeniería bioquímica. Teoría y aplicaciones. 3a reimpresión. México: Alhambra; 1993.
2. Wang DIC, Cooney ChL, Demain AL, Dunnill P, Humphrey AE, Lilly MD. Fermentation and enzyme technology. U.S.A.: John Willey and Sons; 1979.
3. Moller JA, Coghill DR. Production of penicillin in surface culture. En: Thoma WR, editor. Industrial microbiology. Pennsylvania: Dowden Hutchinson and Ross, Inc.; 1977. Vol. 12. p. 111-132.
4. Moller JA, Coghill DR. The laboratory scale production of penicillin in submerged cultures by *Penicillium notatum* Westling (NRRL 832). En: Thoma WR, editor. Industrial microbiology. Pennsylvania: Dowden Hutchinson and Ross, Inc.; 1977: Vol. 12. p. 133-135.
5. Pepler HJ, Perlman D, editors. Microbial technology. Fermentation technology. 2th ed. Vol. I. U.S.A.: Academic Press, Inc.; 1979.
6. Demain AL, Davies JE. Manual of industrial microbiology and biotechnology. 2th ed. Washington, D.C.: ASM Press; 1999.
7. Crueger W, Crueger A. Biotecnología. Manual de microbiología industrial. España: Editorial Acirbia S. A; 1989.
8. Sharma DK. Microbiology. India: Alpha Science; 2013.
9. Brock TD, Madigan MT. Microbiología. 6a ed. México: Prentice Hall Hispanoamericana S.A.; 1993.