

24.68



**Universidad Nacional Autónoma de México**

Facultad de Química

**FORMACION DE UNA SUBCOLECCION DE  
CEPAS DE INTERES INDUSTRIAL  
PARA EL CEPARIO DE LA  
FACULTAD DE QUIMICA**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P r e s e n t a :**

**María del Carmen Iturbe Andreu**



## **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 está 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.

## C O N T E N I D O

1. INTRODUCCION
2. GENERALIDADES
  - 2.1 Importancia de las sustancias producidas por los Microorganismos que integran esta subcolección.
  - 2.2 Microorganismos utilizados.
  - 2.3 Características de las Bacterias que integran esta subcolección.
  - 2.4 Características de las Levaduras y Hongos que integran esta subcolección.
  - 2.5 Métodos Analíticos para cuantificar los productos de las fermentaciones.
  - 2.6 Controles Microbiológicos.
  - 2.7 Conservación de Cepas.
3. MATERIAL Y METODOS
  - 3.1 Material y Equipo.
  - 3.2 Métodos para la Producción y Cuantificación de los productos que integran esta subcolección.
4. RESULTADOS
5. DISCUSION
6. CONCLUSIONES
7. BIBLIOGRAFIA

## 1. INTRODUCCION

Desde siempre el hombre ha utilizado las fermentaciones microbianas para producir y conservar sus alimentos, para producir sustancias que le ayuden a conservar su salud, y para procesar desperdicios. Pero la Microbiología Industrial como tal es relativamente una ciencia nueva; solamente tiene un poco más de cien años.

Los principios de la Microbiología Industrial fueron establecidos por Pasteur cuando demostró indiscutiblemente que la fermentación alcohólica era producida por levaduras. Desde entonces, y principalmente durante la segunda guerra mundial, se desarrollaron una gran cantidad de procesos para la producción de ácidos orgánicos, vitaminas, enzimas, antibióticos y aminoácidos principalmente.

Antes de continuar es necesario definir el término "fermentación" : Bioquímicamente fermentación se le llama al proceso anaerobio de degradación de un sustrato (glucosa), donde el aceptor final de electrones es un metabolito derivado del propio sustrato, como etanol, ácido láctico o glicerol.

En Microbiología Industrial la aplicación del término es diferente : Originalmente se refería al burbujeo observado cuando el azúcar o el almidón eran sometidos a transformaciones por levaduras en las bebidas alcohólicas; después, fue aplicado el proceso por el cual se forma alcohol a partir de azúcar. Actualmente el vocablo "fermentación" se aplica a todos los procesos microbianos en los cuales se produce alguna sustancia útil, a partir de un sustrato orgánico adecuado.

En la última década se han desarrollado dos áreas importantes dentro de las fermentaciones microbianas : La producción de proteína unicelular o biomasa y la tecnología enzimática, como respuesta a las necesidades de producir alimentos baratos en gran escala, y a sus aplicaciones en el área médica.

La Microbiología Industrial no sólo ha avanzado y tenido éxito en procesos

industriales, sino que ha contribuido al mejor conocimiento del metabolismo microbiano en diferentes condiciones ambientales y de los cambios a nivel celular que ocurren cuando el medio ambiente varía.

El futuro y los retos que enfrentará la Microbiología Industrial son muy variados y como ejemplos podemos mencionar : La síntesis enzimática por células inmovilizadas, el uso de celulosa como materia prima principal para las fermentaciones, el cultivo de anticuerpos para detección clínica y purificación de sustancias y tantas aplicaciones como necesidades y conocimientos al respecto vayan surgiendo en el futuro; la mejor muestra de la importancia presente y futura de la Microbiología Industrial es la proliferación de la literatura relacionada y la gran cantidad de investigadores dedicados a trabajos en el área.

El propósito de la presente tesis es formar una subcolección de microorganismos, para el Departamento de la Facultad de Química, que sean útiles para la producción de distintas sustancias de interés industrial, así como la implementación de medios de cultivo y las condiciones óptimas para la producción de estas sustancias en cantidades significativas.

## 2. GENERALIDADES

El número de fermentaciones industriales aplicado actualmente es tan grande que existen algunas colecciones de cepas en el mundo que se dedican únicamente a la conservación de microorganismos industriales como la NCIB (National Collection of Industrial Bacteria) en Escocia.

Para una colección regional y dedicada a la enseñanza como es la Facultad de Química se seleccionaron sólo unas cuantas cepas en función de su disponibilidad, es decir, se buscaron microorganismos representativos de los procesos de fermentaciones industriales más comunes, que se tuvieran dentro del acervo del Cepario de la Facultad de Química, o se pudieran obtener de alguna otra colección.

Los productos obtenidos por métodos microbiológicos son muy variados y numerosos; así que en este trabajo se seleccionaron en función de las necesidades de las prácticas de laboratorio de las materias de Microbiología Industrial, Enología, Biosíntesis Microbiana de Aplicación Industrial, Fisiología y Bioquímica de Microorganismos, Tecnología de Alimentos; para que esta subcolección de cepas resultara de utilidad.

Para verificar las cantidades de las sustancias producidas por los microorganismos se utilizaron métodos de valoración físicos, químicos, y microbiológicos rápidos, sencillos y algunos específicos para las sustancias además de confiables.

Las cepas de esta subcolección se conservaron mediante el método de liofilización por que es un método apropiado para la conservación a largo plazo y, lo más importante, es que con este método se evita la pérdida de las características que las hacen valiosas para las fermentaciones industriales.

2.1 IMPORTANCIA DE LAS SUSTANCIAS PRODUCIDAS POR LOS MICROORGANISMOS  
QUE INTEGRAN ESTA SUBCOLECCION

ACIDOS ORGANICOS :

La conversión microbiológica de carbohidratos a ácidos orgánicos útiles industrialmente ha sido estudiada por muchos laboratorios durante los últimos cincuenta años. Entre los procesos más investigados están la producción de ácido cítrico, fumérico, glucónico, acético, itacónico y láctico.

Los procesos y los mecanismos de síntesis para la formación de estos ácidos ha ayudado en gran medida a entender muchas otras fermentaciones producidas por microorganismos. Los ácidos orgánicos que pueden ser producidos por microorganismos que integran esta subcolección son :

Acido cítrico

Acido acético

Acido láctico

Acido cítrico :

El ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ), un ácido tricarboxílico fue aislado por primera vez en 1784 por Scheele del jugo de limón. En 1893 Wehmer descubrió que el ácido cítrico podía ser producido por ciertos hongos de los géneros Mucor y Aspergillus a partir de sacarosa como fuente de carbono y al pH bajos para evitar la formación de ácido oxálico. Hoy en día casi todo el ácido cítrico que se utiliza en alimentos y otras industrias procede de fermentaciones microbianas ya que los hongos producen mayor cantidad de este ácido a menor precio que el obtenido por extracción de los cítricos.

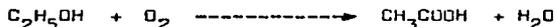
El ácido cítrico tiene una gran variedad de usos : El 70 % de ácido producido es utilizado en la industria alimentaria y de bebidas; el 12 % se utiliza en la industria farmacéutica y el 18 % restante para otro tipo de aplicaciones industriales como en la industria de los detergentes.

La producción de ácido cítrico por hongos depende del ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs; este ciclo es complejo e involucra gran cantidad de enzimas. Se ha encontrado que durante el periodo de acumulación de ácido cítrico durante la fermentación, el ciclo de Krebs normal es interrumpido y como consecuencia la actividad específica de la enzima condensante decrece a una décima parte de la normal y las actividades de la isocitrato deshidrogenasa y la aconitasa practicamente desaparecen.

El punto de partida de la síntesis del ácido cítrico es el oxaloacetato que se encuentra en la parte final del ciclo de Krebs, pero para que se produzca una cantidad mayor de ácido, es necesaria la presencia de un suministro diferente de oxaloacetato y ésta puede ser obtenida del piruvato de la forma siguiente : Primeramente mediante una carboxilación del piruvato a malato, catalizada por medio de la malato deshidrogenasa, y después la transformación de malato a oxaloacetato por medio de una enzima málica. También se puede obtener más oxaloacetato por carboxilación del fosfoenol-piruvato, precursor del piruvato.

#### Acido acético :

El ácido acético se produce mediante un proceso oxidativo en donde soluciones diluidas de etanol (mosto) son oxidadas por microorganismos del género Acetobacter con el oxígeno del aire a ácido acético y agua. La reacción de oxidación es la siguiente :



Todos los mostos deben contener etanol, agua y nutrientes para el desarrollo de la bacteria. Para una fermentación satisfactoria de ácido acético, el etanol debe oxidarse cuantitativamente a este ácido. Los rendimientos del 95 al 98 % son normales; el ácido acético formado no es oxidado posteriormente a  $CO_2$  y agua. Es sabido que la oxidación del etanol se lleva a cabo en dos pa-

tos con acetaldehído como producto intermedio.

Después de estudiar ampliamente a las bacterias del género Acetobacter se pudo presentar un esquema general de la oxidación de etanol a ácido acético : El etanol es oxidado por la enzima Alcohol-citocromo-553-reductasa a acetaldehído posteriormente este es oxidado por una enzima independiente la aldehído-deshidrogenasa, incorporando el producto al ciclo de los ácidos tricarbóxicos para formar el ácido acético.

Acido láctico y Fermentación láctica :

La preparación de alimentos por fermentación láctica es uno de los métodos de conservación más importantes. Un ejemplo de alimentos producidos totalmente o sólo parcialmente por fermentación láctica en salmuera son los pepinillos y las aceitunas. Los microorganismos más comunmente usados en este tipo de fermentación son Leuconostoc mesenteroides y Lactobacillus plantarum.

Existe otro tipo de fermentación láctica además de la en salmuera y es cuando se utiliza como sustrato leche y mediante algunas bacterias lácticas se producen derivados lácteos como quesos y yogurts.

En ambos tipos de fermentación se metabolizan los carbohidratos por la vía glucolítica y se produce ácido láctico en condiciones anaerobias.

## ENZIMAS

Las enzimas son proteínas producidas por los organismos vivos para catalizar reacciones químicas específicas; su función biológica es la de realizar las reacciones metabólicas de plantas, animales y microorganismos. Las enzimas pueden obtenerse de cualquiera de estos organismos, pero las formas más frecuentemente utilizadas de obtenerlas es sin duda a partir de microorganismos ya que se requiere de menos espacio para producir una mayor cantidad de enzimas que utilizando plantas o animales. Otra ventaja de utilizar microorganismos

mos es que muchas enzimas producidas por estos son extracelulares y son liberadas al medio de cultivo, facilitando así su obtención ya que las enzimas intracelulares contienen contaminantes celulares por los procesos de obtención.

#### $\alpha$ - Amilasa :

Esta enzima ( $\alpha$ -1-4-glucan-glucanohidrolasa) es utilizada en la industria en la fabricación de papeles y telas, durante la fabricación de jarabes de glucosa, en los procesos de elaboración de cerveza y en las modificaciones de almidón para adhesivos.

Los mecanismos que regulan la formación de  $\alpha$ - amilasa en general no están del todo claros (1). Sin embargo Coleman (1967) estableció que la producción de  $\alpha$ - amilasa por B.subtilis es controlada por la cantidad de ácidos nucleicos precursores. Schaeffer (1969) y Meers (1972) encontraron que la biosíntesis de esta enzima es regulada por represión catabólica. Usando una fuente de carbono limitada en el medio demostraron que no se requiere de inductor para la biosíntesis de esta enzima.

#### Proteasa :

Las proteasas microbianas que son interesantes desde el punto de vista de la industria alimentaria son todas del tipo de las endopeptidasas que son enzimas extranucleares.

Las enzimas proteolíticas producidas por microorganismos están clasificadas dentro de cuatro grupos de acuerdo al esquema de Hartley (1960) basado en su mecanismo de acción : Serin-proteasas, tiol-proteasas, metalo-proteasas y aci-proteasas. Muchos microorganismos producen más de un tipo de proteasas y esto depende en gran medida de la composición del medio de cultivo.

Las proteasas microbianas son usadas en gran escala para los detergentes que

(1) Prescott and Dunn's (1982) Industrial Microbiology. 4<sup>th</sup> edition

cuentan enzimas o detergentes biológicos, pero no se utilizan mucho en la industria alimentaria salvo en la producción de proteína hidrolizada como complemento alimentario.

#### Triptofanasa :

La triptofanasa (triptofano-indol-liasa) es una enzima que cataliza la conversión estequiométrica de L-triptofano a pirúvico, amoníaco e indol.

Esta enzima ha sido aislada y purificada de muchos microorganismos y ha presentado características muy similares en todos ellos. La triptofanasa es una enzima inducible y sensible a represión catabólica por glucosa en la mayoría de los microorganismos.

La descomposición del triptofano se consideraba irreversible hasta que en 1972 Watanabe y Snell demostraron que el triptofano puede ser sintetizado por la triptofanasa a partir de indol, pirúvico y amoníaco con muy buen rendimiento. Fue por esta capacidad de sintetizar triptofano, un aminoácido de interés industrial, que se procedió al estudio y aislamiento de microorganismos productores de esta enzima.

#### VITAMINAS Y AMINOACIDOS

Las vitaminas se definen comúnmente como compuestos orgánicos presentes en pequeñas cantidades en productos de origen natural, aprovechables por el hombre durante la alimentación. La participación de las vitaminas en la nutrición de los animales y el hombre está bien establecida; la falta de éstos compuestos afecta el buen funcionamiento del organismo y puede llevar a la muerte.

Algunos microorganismos son capaces de producir por sí mismos todos los factores de crecimiento, en particular las vitaminas, que ellos necesitan; por lo que es posible, cultivar éstos microorganismos y obtener ciertas vitaminas como la B<sub>2</sub> o riboflavina y la B<sub>12</sub> o cianocobalamina la cual sólo se puede obtener industrialmente por este método.

#### Riboflavina :

La riboflavina o vitamina B<sub>2</sub> está formada por un componente tricíclico flavínico (lumicromo) y de ribosa. La vía de síntesis de este compuesto es compleja y proviene en parte de la conversión de un nucleótido de GTP. La riboflavina interviene en la síntesis de las coenzimas flavínicas.

Una gran cantidad de microorganismos son capaces de sintetizar este producto pero los mejores productores son sin duda Eremotecium ashbyii y Ashbya gossypii.

#### Cianocobalamina :

La cianocobalamina o vitamina B<sub>12</sub> es conocida como el factor anti-anemia perniciosa. Su estructura fundamental es la de un anillo pseudoporfirínico unido a un átomo de cobalto. Los núcleos de pirrol que forman el anillo se sintetizan a partir de la condensación de succinato y glicina; después de la ciclación se incorpora el cobalto. Los microorganismos mejores productores pertenecen al género Streptomyces. La vitamina B<sub>12</sub> permanece siempre intracelular y para su utilización es necesario romper las células.

La producción mediante fermentación de aminoácidos se convirtió en una realidad con el descubrimiento de un producto efectivo de el ácido glutámico por Kinoshita et. al en 1957. La principal razón para la obtención industrial de aminoácidos es la de elevar el valor nutricional de los alimentos a bajo costo, enriqueciéndolos con aminoácidos esenciales. Los aminoácidos se sintetizan en las células y son utilizados por éstas para la producción de proteínas; la producción de estos aminoácidos requiere de un gran aporte energético por parte de la célula por lo que existen gran cantidad de mecanismos de regulación. Así para que los microorganismos acumulen y excreten al medio de cultivo los aminoácidos es necesari-

rio modificar las vías de síntesis y los sistemas de regulación; esto se logra con mutantes de los microorganismos.

Acido glutámico :

El L-glutamato se forma por aminación del  $\alpha$ -cetoglutarato que se produce en el ciclo de Krebs. El C. glutamicum acumula ácido glutámico en presencia de un exceso de  $\text{NH}_3$  debido a que ha perdido la enzima capaz de formar succinato a partir de cetoglutarato por una mutación.

#### ANTIBIOTICOS

Los antibióticos son sustancias producidas por microorganismos que tienen la capacidad de inhibir o destruir a otros microorganismos. Su interés industrial surgió durante la segunda guerra mundial cuando la necesidad de tratamientos contra las infecciones se hizo más importante.

Los antibióticos son sustancias específicas que no tienen una distribución generalizada entre los microorganismos ya que no los producen sino limitado número de especies. El género Streptomyces agrupa una gran cantidad de los microorganismos productores de antibióticos.

Penicilina :

Las penicilinas son sustancias con un heterociclo  $\beta$ -lactametazolidina, producidas por especies del género Penicillium. La penicilina es excretada al principio de la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo y se extrae del medio de cultivo fácilmente mediante disolventes. Para una buena producción de penicilina es necesario entre otras cosas, la aireación del medio de cultivo y la regulación del pH cercano a 7.0.

Las penicilinas son capaces de inhibir la síntesis de la pared celular.

Actúan sobre las bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas. La mayoría de las penicilinas pueden ser descompuestas por microorganismos que posean una penicilinasasa que las transformen en ácido penicilínico inactivo.

#### Polimixina :

Se trata de un péptido circular que es producido por una especie del género Bacillus específicamente por Bacillus polymyxa. Las polimixinas contienen ácido L-diaminobutírico, ácido 6-metil-octanóico y algunas veces D-leucina. La producción se efectúa en la fase estacionaria del desarrollo de los microorganismos, su modo de acción es variable. La polimixina actúa sobre la membrana provocando la lisis de las células; actúan sobre las bacterias Gram negativas.

#### Estreptomycinina :

La estreptomycinina producida por Streptomyces griseus fué uno de los antibióticos más utilizados durante los años cincuentas y sesentas pues actúa sobre gran cantidad de bacterias Gram negativas; pero su principal uso fué para el tratamiento contra la tuberculosis producidas por especies del género Micobacterium bacterias Gram positiva. Actualmente su uso ha descendido debido a que está comprobado que afecta las células pilosas del oído y puede causar sordera. Su producción se realiza en la fase estacionaria del crecimiento en medio de cultivo aireado y a pH regulado.

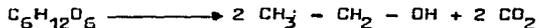
#### ETANOL Y BEBIDAS ALCOHOLICAS

Uno de los primeros productos microbianos obtenidos por el hombre fué el vino, que es el producto final de la fermentación alcohólica del jugo de uvas frescas. El cultivo de la vid se lleva a cabo en las zonas subtropicales de

la tierra y la producción de vino mundial anualmente excede los 293 millones de litros.

El jugo de uva, materia prima para la producción de vino y otras bebidas alcoholicas, contiene agua, carbohidratos, compuestos nitrogenados, minerales, taninos, pigmentos, vitaminas, enzimas y compuestos aromáticos.

El azúcar y los compuestos nitrogenados que se forman durante el crecimiento y maduración de la uva son los principales sustratos para la subsecuente fermentación. El contenido de azúcares fermentables en el jugo de uva depende de la variedad de la uva y varía entre 120 y 250 g / l, Este contenido de azúcares fermentables es aprovechado por levaduras del género Saccharomyces para llevar a cabo una fermentación alcohólica; este género de levaduras es capaz de producir altas concentraciones de etanol; la ecuación que presenta de una forma fácil el proceso total por el cual el azúcar es transformada en etanol y CO<sub>2</sub> es la siguiente :



Todas las reacciones que intervienen en este proceso son catalizadas por enzimas específicas. La producción de etanol se lleva a cabo en dos etapas :  
Período de inducción en donde se forma ácido pirúvico a partir de una hexosa que es convertida primeramente a glicerol y en la segunda etapa o estado estacionario se forma el etanol a partir del ácido pirúvico.

El etanol producido por fermentaciones microbianas tiene además aplicaciones en otras industrias como en la fabricación de acetaldehído y como disolvente.

## 2.2 MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Muchos microorganismos producen algún compuesto bioquímico de importancia para el hombre, a bajo costo y en grandes cantidades; Por esta razón se han ideado a través del tiempo procesos para la producción, en gran escala y con fines industriales, de estos compuestos. A dichos procesos se les denomina "fermentaciones" aunque no se trate de una fermentación en el sentido bioquímico propiamente dicho.

Para que una fermentación se realice son necesarios los siguientes requisitos :

A) tener un microorganismo de características idóneas para cada producto en particular,

B) proveer un medio de cultivo adecuado que contenga todos los nutrientes esenciales para la producción óptima del producto, y

C) establecer y controlar las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de la fermentación.

Como resultado se obtendrá una cantidad mayor de microorganismos que la inicial y diversos productos como vitaminas, antibióticos, ácidos orgánicos, enzimas, etc.

Los microorganismos utilizados en las fermentaciones son generalmente bacterias, hongos y levaduras que han sido aislados del medio ambiente donde producen alguno de los productos que le interesan al hombre; una vez aislados, los microorganismos son sometidos a procesos de mejoramiento para obtener cepas altamente productoras, estables y cuyos requerimientos nutricionales y condiciones fisicoquímicas de cultivo sean conocidas.

A continuación se enumeran los microorganismos que integran esta subcolección y el compuesto bioquímico que producen.

Bacillus subtilis C<sub>1</sub> y ATCC 6633

Para la producción de amilasas.

Proteus rettgerii ATCC 9918

Para la producción de triptofanasa.

Bacillus subtilis C<sub>1</sub>, 85-Y-1021, y ATCC 6051

Para la producción de proteasas.

Aspergillus niger EM-2 y EM-3

Para la producción de ácido cítrico.

Lactobacillus delbreuckii

Para la producción de ácido láctico.

Acetobacter suboxydans

Para la producción de ácido acético.

Corynebacterium glutamicum

Para la producción de ácido glutámico.

Streptomyces olivaceus

Para la producción de vitamina B<sub>12</sub>.

Ashbya gossypii

Para la producción de vitamina B<sub>2</sub>.

Streptomyces griseus

Para la producción de estreptomocina.

Penicillium s.p

Para la producción de penicilina.

Bacillus polymyxa

Para la producción de polimixina.

Saccharomyces cerevisiae

Para la producción de etanol

## 2.3 CARACTERISTICAS DE LAS BACTERIAS QUE INTEGRAN ESTA SUBCOLECCION

### BACILOS Y COCOS ESPORULADOS

#### Género Bacillus :

Bastoncillos rectos de 0.3 a 2.2 por 1.2 a 7.0  $\mu\text{m}$ . La mayoría móviles mediante flagelos anfitricos. Forman endosporas resistentes al calor. Gram positivos, aunque puede volverse variable, con la edad del cultivo.

El rango de temperatura a la que pueden crecer es amplio y va desde  $-5^{\circ}\text{C}$  hasta  $75^{\circ}\text{C}$ ; la temperatura óptima es de  $35^{\circ}\text{C}$ . Los valores de pH varían desde 2 hasta 8; el pH óptimo es de 7.0-7.4. Crecen en concentraciones de 2 al 25 % de NaCl.

La característica más significativa de este género es su capacidad para formar esporas. La esporulación depende de las condiciones de cultivo especialmente de una cantidad suficiente de manganeso.

Quimioorganótrofos; metabolismo estrictamente respiratorio, estrictamente fermentativo o ambos respiratorio y fermentativo, utilizando varios sustratos. El aceptor final en el metabolismo respiratorio es el oxígeno molecular.

Los requerimientos nutricionales para las formas vegetativas van desde las más simples con una sola fuente de carbono y energía, con nitrógeno inorgánico y sin factores de crecimiento, hasta requerimientos muy complejos.

#### Bacillus subtilis :

Bacilos en pares, raramente en cadenas, la tinción de Gram es positiva y uniforme, móviles con flagelos anfitricos. Forman endosporas de 0.8 por 1.5 a 1.8  $\mu\text{m}$ , la superficie de las esporas tinte débilmente con la tinción de Gram. Durante la germinación la cubierta de las esporas se rompe por la mitad. Catalasa positivo, producen ácido a partir de arabinosa, xilosa y manitol. Crecen a temperaturas entre  $10^{\circ}\text{C}$  y  $55^{\circ}\text{C}$ ; temperatura óptima  $35^{\circ}\text{C}$ . pH entre 5.5 y 8.5, pueden crecer en 7 % de NaCl. Hidrolizan la caseína.

En agar las colonias son redondas o irregulares, la superficie es roma, gruesa y opaca, pueden producir una coloración café o crema.

Los requerimientos nutricionales para su desarrollo son mínimos; no requiere vitaminas y utiliza glucosa, citrato y sales de amonio como unicas fuentes de carbono y nitrógeno.

#### CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

PRUEBA	RESULTADO
Movilidad	+
Reducción de $\text{NO}_3^-$ a $\text{NO}_2^-$	+
Frueba de catalasa	+
Hidrólisis de almidón	+
Crecimiento anaeróbico	-
Crecimiento en 7.6 % NaCl	+

#### FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

PRUEBA	RESULTADO
Glucosa (ácido)	+
Glucosa (gas)	-
Xilosa	+
Manitol	+
Arabinosa	+

Los símbolos usados son :

- + ..... Positivo (para 90-100 % de las cepas)
- ..... Negativo (para 90-100 % de las cepas)

#### Bacillus polymyxa

Sinonimos : Clostridium polymyxa, Granulobacter polymyxa, Aerobacillus polymyxa

Bacilos Gram positivos de 0.6 a 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho por 2 a 5  $\mu\text{m}$  de largo; móviles mediante flagelos peritricos. Forman endosporas; fermentan la glucosa y los

principales productos de esta fermentación son : etanol, 2-3 butanodiol,  $CO_2$  e  $H_2$ ; Producen polimixina.

Fijan nitrógeno en condiciones anaeróbicas; temperatura de desarrollo entre los  $5^\circ C$  y los  $45^\circ C$ ; temperatura óptima  $35^\circ C$ ; pH óptimo 6.0-7.0

El medio mínimo para que desarrollen consta de una fuente de carbono,  $NH_4-N$ , y biotina. Gran desarrollo en condiciones anaerobias en presencia de carbohidratos fermentables.

#### CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

PRUEBA	RESULTADO
Movilidad	+
Hidrólisis de caseína	+
Crecimiento anaeróbico	+
Crecimiento en 5 % NaCl	-
Reducción $NO_3^-$ a $NO_2^-$	+

#### FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

PRUEBA	RESULTADO
Glucosa (ácido)	+
Glucosa (gas)	+
Arabinosa (gas)	+
Xilosa	+
Manitol	+

Los símbolos usados son :

- + ..... Positivo (para 90-100 % de las cepas)
- ..... Negativo (para 90-100 % de las cepas)

## BACILOS GRAM POSITIVOS NO ESPORULADOS

### Género Lactobacillus :

Bacilos largos y delgados o tan cortos como cocobacilos. Forman cadenas en la fase logarítmica tardía. Inmóviles o móviles mediante flagelos peritricos. No esporulados. Gram positivos pero en cultivos viejos el Gram puede cambiar a negativo; algunas cepas presentan granulaciones internas o tejidos disparejos al Gram o con azul de metileno. Crecen en rangos de temperatura de 5 °C a 53 °C; las temperaturas óptimas van de 30 °C a 40 °C. El pH óptimo es de 5.0-5.8 o menor. Acidúricos. Fermentan la glucosa y pueden bajar el pH del medio en una unidad o más. Al menos la mitad de los productos finales de carbono son lactato el cual no fermentan.

Requerimientos nutricionales complejos; requieren aminoácidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales inorgánicas, péptidos, ácidos grasos y carbohidratos.

Se encuentran generalmente en lácteos y derivados, granos, cerveza, vinos, frutas y jugos; pueden encontrarse en la boca, tracto intestinal y vagina de animales y humanos. Rara vez son patógenos.

### Lactobacillus delbreuckii

Sinónimos : Bacillus delbreuckii, Bacterium delbreuckii, Lactobacterium delbreuckii.

Bacilos de 0.5 a 0.8 por 2 a 9  $\mu$ m con extremos redondeados; aislados o en cadenas cortas. Granulación interna revelada mediante tinción con azul de metileno. Inmóviles. En agar las colonias generalmente son rugosas y no pigmentadas. Formación de ácido sin producción de gas a partir de glucosa y otros carbohidratos.

Producen ácido láctico homofermentativamente. No acidifican la leche. Temperatura óptima 40-44 °C; crecen frecuentemente a 50 o 52 °C; no crecen a 15 °C; el pH óptimo es de 5.0- 5.8. Requieren pantotenato de calcio, niaci-

na y vitamina B<sub>6</sub> para su desarrollo.

#### CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

PRUEBA	RESULTADO
Catalasa	-
Movilidad	-
Indol	-
H <sub>2</sub> S	-

#### FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

PRUEBA	RESULTADO
Amigdelina	-
Arabinosa	-
Fructosa	+
Glucosa (ácido)	+
Glucosa (gas)	-
Lactosa	-
Maltosa	d
Manosa	+

Los símbolos usados son :

- + ..... Positivo (para 90-100 % de las cepas)
- ..... Negativo (para 90-100 % de las cepas)
- d ..... Variable

## BACILOS Y COCOS AEROBIOS GRAM NEGATIVOS

### Género Acetobacter:

Células elipsoidales en forma de bastón rectas o ligeramente curvadas de 0.6 a 0.8  $\mu\text{m}$  por 1.0 a 3.0  $\mu\text{m}$ ; pueden encontrarse aislados, en pares o en cadenas, inmóviles o móviles mediante flagelos peritricos. No presentan endosporas. Son Gram negativos pero en cultivos viejos el Gram puede volverse variable.

Quimioorganótrofos con metabolismo respiratorio nunca fermentativo. Oxidan el etanol a ácido acético, no hidrolizan el almidón, la dextrina ni la lactosa. Por lo general no producen pigmento pero algunas cepas producen un pigmento café soluble en agua.

Crecen en medios simples y complejos; la mayoría de las cepas no requieren vitaminas para su desarrollo. Aerobios estrictos. Crecen en temperaturas de 5 °C a 42 °C con óptimas de 30 °C; pH óptimo 5.4-6.3; algunas cepas crecen a pH de 4.0 o menores. Se encuentran en frutas y vegetales, frutas fermentadas, jugos, vinagre y bebidas alcohólicas.

### Acetobacter suboxydans

Bacilos cortos aislados o en cadenas, inmóviles, Gram negativos.

Forman ácido en presencia de etanol, propanol, glicol, glicerol, glucosa, y sorbitol. No hidrolizan el almidón; temperatura óptima 30 °C; pH óptimo 3.8. Quimioorganótrofos con metabolismo respiratorio.

Requerimientos nutricionales mínimos para su desarrollo : ácido pantoténico, ácido nicotínico, ácido p-aminobenzoico, valina, alanina, isoleucina, histidina, cistina, prolina, sales minerales y un sustrato oxidable como el alcohol

Se encuentran en la cerveza y algunas veces en la fruta fermentada y en vinagre de vino; fué aislado por primera vez de cerveza rancia.

## CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

PRUEBA	RESULTADO
Catalasa	+
Movilidad	d
Hidrólisis de almidón	-

## FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

PRUEBA	RESULTADO
Glucosa (ácido)	+
Arabinosa	+
Manosa	+
Xilosa	+

Los símbolos usados son :

- + ..... Positivo (para 90-100 % de las cepas)
- ..... Negativo ( para 90-100 % de las cepas)
- d ..... Variable

## COCOS GRAM POSITIVOS

En la octava edición del manual de Bergey's los géneros Micobacterium, Cellulomonas, y Arthrobacter se adicionaron al género Corynebacteriaceae debido a que se estableció que en algunas etapas en el desarrollo de estos géneros pueden encontrarse similitudes morfológicas como DAP en la pared celular y el rango de G + C con valores entre 53.1 ± 1.3

### Género Corynebacteriaceae :

Cocos de 0.5 a 3.5 µm de diámetro, aislados o en pares pero generalmente en racimos, tetradas o paquetes cúbicos. No esporulados, inmóviles, Gram positivos; los cultivos viejos pueden volverse Gram negativos. Temperatura óptima de desarrollo de 25 °C a 30 °C. Crecen en presencia de NaCl al 5 % .  
Quimioorganótrofos con metabolismo estrictamente respiratorio. Aerobios estrictos; requerimientos nutricionales variables; pueden incluir biotina y

tiamina como factores de crecimiento.

Corynebacterium glutamicum

Sinonimos : Micrococcus glutamicus

Cocos Gram positivos de 0.5 a 3.5  $\mu\text{m}$  de diámetro en racimos, tetradas o paquetes cúbicos, inmóviles, no esporulados. Temperatura óptima de crecimiento 30 °C; pH óptimo 7.0-8.0

Quimioorganótrofos con metabolismo respiratorio, nunca fermentativo. Aerobios estrictos, crecen en presencia de concentraciones al 5 % de NaCl; fermentan la glucosa; catalasa positivo. Requerimientos nutricionales variables.

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

PRUEBA	RESULTADO
Movilidad	-
Crecimiento en 5 % NaCl	+
Catalasa	+
Formación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-

FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

PRUEBA	RESULTADO
Glucosa (ácido)	+
Glucosa (gas)	-
Xilosa	-

Los símbolos usados son :

- + ..... Positivo (para 90-100 % de las cepas)
- ..... Negativo (para 90-100 % de las cepas)

## BACILOS ANAEROBIOS FACULTATIVOS GRAM NEGATIVOS

### Género Proteus :

Bacilos rectos pequeños de 0.4 a 0.6 por 1.0 a 3.0  $\mu\text{m}$ , en pares o cadenas; Gram negativos. No capsulados; móviles mediante flagelos peritricos. Forman ácido a partir de glucosa y más lentamente a partir de fructosa, galactosa y glicerol. La prueba con rojo de metilo es positiva. Reducen nitratos a nitritos; forman indol. Rango de temperatura entre 10 °C y 43 °C; temperatura óptima 37 °C. Crecen rápidamente en medios que contienen extracto de carne pero algunas especies necesitan requerimientos nutricionales especiales.

Catalasa positiva; quimioorganótrofos con metabolismo respiratorio y fermentativo.

### Proteus rettgerii

Sinónimos : Bacterium rettgerii, Shigella rettgerii, Proteus entericus

Bacilos pequeños Gram negativos, móviles mediante flagelos peritricos.

Temperatura óptima de crecimiento 37 °C; pH óptimo 9.0

Requerimientos nutricionales mínimos. Algunas cepas producen gas a partir de glucosa, producen indol y son ureasa positivos. Fueron aislados por primera vez de las heces de los pollos.

### CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

PRUEBA	RESULTADO
Producción de indol	+
Ureasa	+
Catalasa	+
Liquefacción de gelatina	-
H <sub>2</sub> S	-

## FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

PRUEBA	RESULTADO
Glucosa (gas)	d
Amigdalina	-
Celobiosa	d
Inositol	+
Maltosa	-
Manitol	+
Menosa	+
Xilosa	d
Sacerosa	d

Los símbolos usados son :

- + ..... Positivo (para 90-100 % de las cepas)
- ..... Negativo (para 90-100 % de las cepas)
- d ..... Variable

## ACTINOMICETOS Y ORGANISMOS RELACIONADOS

### Género Streptomyces :

El micelio aereo de las formas maduras se encuentra en cadenas de tres o muchas esporas de 0.5 a 2  $\mu$ m de diámetro. Gram positivo.

Las colonias en agar son pequeñas (1-10 mm de diámetro) aisladas, coriáceas o butiráceas; inicialmente la superficie de las colonias es relativamente lisa pero después, con la formación del micelio aereo, aparece granuloso, quebradizo, stercioipelado o velludo. Producen una gran variedad de pigmentos dependiendo del color del micelio aereo y del sustrato.

Heterótrofos; muchas especies producen uno o más antibióticos. Utilizan glucosa para su desarrollo; generalmente hidrolizan caseína, gelatina y almidón; reducen nitratos a nitritos; son aerobios. Temperatura óptima 25° C a 35° C; pH óptimo 6.5-8.0

Streptomyces griseus

sinonimos : Actinomyces griseus

Desarrollo vegetativo : Colonias lisas inicialmente incoloras pero posteriormente toman un color amarillo verdoso. Gram positivas.

Micelio aereo : Abundante, quebradizo de color verde agua, esporas esféricas o elipsoidales de 0.8 a 1.7 micrones.

En agar el desarrollo es abundante de color crema, algunas veces incoloro; el micelio aereo es quebradizo de color blanco o gris claro. El pigmento es no soluble. Hidrolizan el almidón, reducen nitratos a nitritos. Aerobios estrictos. Temperatura óptima 28 ° C; pH óptimo 6.8

Producen estreptomycin que es un antibiótico activo contra un gran número de bacterias y actinomicetos pero no contra virus y hongos. Aislado de tierra de jardín, lodo de ríos y del pico de las gallinas.

UTILIZACION DE COMPUESTOS CARBONADOS

PRUEBA	RESULTADO
Glucosa	+
Xilosa	+
Arabinosa	-
Ramnose	-
Fructosa	+
Galactosa	+
Manitol	+
Inositol	-
Sacarosa	-

Los símbolos usados son :

+ ..... Positivo (para 90-100 % de las cepas)

- ..... Negativo (para 90-100 % de las cepas)

Streptomyces olivaceus

Sinónimos : Actinomyces olivaceus

Colonias lisas pigmentadas de color verde amarillento; Gram positivas. Micelio aereo stercoipelado verde amarillento con esporas esféricas o elipsoidales; pigmento no soluble. Temperatura óptima 28 ° C; pH óptimo 6.0; hidrolizan el almidón, reducen nitratos a nitritos. Producen Vitamina B<sub>12</sub> ; su desarrollo es inhibido por estreptomycinina; toleran hasta 10 % de NaCl en el medio de cultivo. Aerobios estrictos.

UTILIZACION DE COMPUESTOS CARBONADOS

PRUEBA	RESULTADO
Glucosa	+
Xilosa	+
Arabinosa	+
Ramnose	+
Fructosa	+
Galectosa	-
Manitol	+
Inositol	+
Sacarosa	+

Los símbolos usados son :

- + ..... Positivo (para 90-100 % de las cepas)
- ..... Negativo (para 90-100 % de las cepas)

## 2.4 CARACTERISTICAS DE LAS LEVADURAS Y HONGOS QUE INTEGRAN ESTA SUBCOLECCION

### Clase Ascomycetes

#### Saccharomyces cerevisiae

Los Saccharomyces son levaduras ascomicetas, (el término levadura se refiere a las formas morfológicas de ascomicetos que poseen un talo predominantemente unicelular, que se reproducen asexualmente por gemación, por fisión, o ambas y producen ascospores libres).

Estas levaduras están ampliamente distribuidas en el mundo; son particularmente abundantes en sustratos que contienen azúcar como néctares de flores y frutas; también se encuentran en la tierra, leche, en asociación con insectos y en vegetales.

Fermentan fácilmente los carbohidratos a alcohol y dióxido de carbono. Son muy utilizadas en la industria cervecera y en panadería.

En contraste con los demás ascomicetos, son organismos unicelulares con pared celular definida y núcleo rodeado por un citoplasma; una vacuola ocupa generalmente una gran parte de la levadura.

Su forma es muy variada y puede ser redonda, ovoide, alargada o rectangular. Algunas veces las células se unen para formar cadenas entonces forman un pseudomicelio. En agar las colonias presentan un color blanco, crema o café; su temperatura óptima de crecimiento es de 28 ° C y el pH óptimo es de 4.0

#### Orden Endomycetales :

Este orden incluye a los hongos en los que dos células se fusionan para formar un cigoto, el cual, se transforma en un asca.

#### Ashbya gossypii

Es muy poco lo que se sabe acerca de este género ya que su clasificación centro de la clase Ascomycetes y dentro del orden Endomycetales es tenta-

tiva. Los géneros Ermothecium y Ashbya son de gran importancia en la producción de riboflavina.

Las ascosporas de estos géneros son en forma de hueso o de aguja. Se reproducen asexualmente o por conjugación de dos células que se ponen en contacto. La temperatura de crecimiento es de 26 °C a 28 °C, el pH entre 5.8 y 7.3; la temperatura óptima es de 28 °C y el pH óptimo 6.0

#### Subdivisión : Deuteromycotina

Esta subdivisión incluye a los hongos cuya reproducción sexual o estado perfecto se desconoce; aquí se agrupan solamente los estados imperfectos o asexuales de Ascomycetos y Basidiomycetos.

Los hongos de esta subdivisión tienen un micelio bien desarrollado, septado con conidióforos característicos, aunque algunas especies tienen un talo unicelular. Solo unos pocos hongos imperfectos carecen de conidios y producen esclerocios. Se encuentran en la naturaleza como saprófitos, pero algunos son parásitos de plantas y animales.

#### Aspergillus niger

Dentro de este género existen más de 200 especies y un gran número de variedades que están distribuidas por casi todo el mundo; pueden crecer en un gran número de sustratos diferentes debido a la gran cantidad de enzimas que producen.

El género Aspergillus causa grandes problemas por ser un contaminante frecuente en cultivos de bacterias y hongos en los laboratorios; también suele causar micosis en los animales y en los humanos, pero por su gran actividad enzimática son empleados en un gran número de procesos industriales.

Aspergillus niger es utilizado para la producción de ácido cítrico y glucónico.

Características morfológicas : Las hifas están bien desarrolladas y profusamente ramificadas, sus células son multinucleadas; los micelios producen una gran cantidad de conidióforos que aunque no están desarrollados surgen individualmente de hifas somáticas. Los conidióforos son largos, rectos y tienen una vesícula hinchada en el ápice. Los conidios son producidos por fiálides que pueden originarse directamente sobre la vesícula (uniseriadas) o sobre mótulas que se originan de las vesículas (biseriadas).

Cuando las fiálides maduran producen conidios en forma de yema o en cadenas, los conidios son típicamente redondos, unicelulares con pared interna rugosa.

#### Penicillium s.p

Este género es tan común y tan cosmopolita como Aspergillus, son llamados hongos verdes y azules por ser los pigmentos característicos de este género.

Se encuentran frecuentemente en frutas y cítricos, en quesos en refrigeración y otros alimentos fácilmente contaminables por sus esporas; algunas especies de penicilios atacan y destruyen frutas. Industrialmente este género es utilizado en la producción de quesos y antibióticos; Las especies de Penicillium notatum y Penicillium chrysogenum se usan para la producción de penicilina aunque muchas otras especies la producen.

Características morfológicas : Las fiálides están arregladas en un penicilio y la cabezuela de esporas a diferencia de otros géneros es seca pues no forma mucílago en cada conidióforo. El micelio produce conidióforos simples, largos y rectos con ramificaciones a dos tercios de la punta que pueden ser simétricos o asimétricos. Los conidios son redondos u ovoides y se forman de la misma manera que en el género Aspergillus.

La gran cantidad de conidios verdes, amarillos o azules son los responsables del color característico de las colonias de varias especies de Penicillium.

## 2.5 METODOS ANALITICOS PARA CUANTIFICAR LOS PRODUCTOS DE LAS FERMENTACIONES

Es necesario el uso de métodos analíticos confiables para cuantificar los productos de fermentación de los microorganismos. Estos métodos deben ser rápidos, simples, exactos además de confiables y deben medir solamente el compuesto de interés en presencia de concentraciones relativamente altas de contaminantes dentro del medio de cultivo. Estos métodos se encuentran generalmente dentro de tres categorías : Métodos físico-químicos, biológicos, o cromatográficos; muchas veces más de uno de estos métodos analíticos son aplicables para un mismo producto de fermentación; en estos casos se deberá usar el método analítico que sea más rápido para cuantificar dicho producto.

### 2.5.1 METODOS FISICOS Y QUIMICOS

Los métodos fisicoquímicos más frecuentemente usados para las valoraciones de los productos de fermentaciones microbianas son : la titulación ácido-base y los métodos espectrométricos.

Los diferentes métodos analíticos se utilizan dependiendo de la selectividad de las reacciones químicas involucradas durante las determinaciones, ya que los caldos de cultivo para las fermentaciones contienen gran cantidad de compuestos además de los que se van a determinar.

Es necesario, por lo tanto, emplear métodos analíticos selectivos a los compuestos a valorar, y, algunas veces es necesaria una purificación parcial del producto de fermentación.

La mayoría de los ácidos orgánicos obtenidos mediante fermentaciones microbianas pueden valorarse rápida y confiablemente por titulaciones ácido-base adicionando simplemente un indicador de pH a la muestra del caldo de cultivo y titulando el ácido con una base fuerte como NaOH hasta que vire el color del indicador

Los métodos espectrométricos se fundamentan en la ley de Beer que se basa en la relación que existe entre la intensidad de color (absorbancia) y la concentración del producto obtenido de la fermentación, mostrada por una curva estandar la cual se prepara relacionando las densidades ópticas observadas con varias concentraciones del compuesto puro.

Como los productos de las fermentaciones microbianas no son coloridos por sí mismos se deben hacer reacciones químicas específicas para obtener un producto colorido que sea cuantificable mediante este método.

#### 2.5.2 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Estos métodos se utilizan para compuestos que estimulan o inhiben cuantitativamente el crecimiento de microorganismos. Los métodos microbiológicos son más difíciles de realizar, proporcionan más error y son menos reproducibles que los métodos físicos o químicos; requieren de una estandarización muy cuidadosa por lo que no se usan si hay otra alternativa.

Los microorganismos para estas determinaciones deben depender para su desarrollo del compuesto a valorar, de tal manera, que se pueda medir su desarrollo o inhibición dependiendo de las concentraciones del compuesto; aquí al igual que en los métodos espectrométricos se requiere de una curva estandar que se hace con diferentes concentraciones del compuesto puro.

Este método se utiliza principalmente para la valoración de vitaminas (que estimulan el desarrollo de ciertos microorganismos) y antibióticos (que inhiben su desarrollo).

Los microorganismos escogidos para los métodos microbiológicos deben reunir ciertas características para hacerlos confiables: Deben ser genéticamente estables para no causar cambios indeseables en las mediciones; deben depender en gran medida de los compuestos a cuantificar y no de los demás compuestos presentes en la solución a medir; deben desarrollar relativamente rápido en el medio de cultivo y, de preferencia, no deben ser patógenos; deben de-

sarrollar de tal manera que faciliten la medición (las células no deben aglutinarse en los métodos turbidimétricos, ni deben pulular en los métodos de difusión de agar), si es posible, los microorganismos deben ser aerobios o anaerobios facultativos pues las determinaciones con microorganismos anaerobios son más difíciles de realizar y se requiere de equipo especial. Los métodos microbiológicos más utilizados son el de difusión de agar y el turbidimétrico.

**Métodos de difusión :** En éstos métodos se utilizan medios sólidos, generalmente de agar, inoculado con el microorganismo; la sustancia en estudio se aplica en un punto del agar y al difundirse en este en forma radial, ocasiona la aparición de zonas de inhibición o crecimiento del microorganismo. Estas zonas se comparan con una curva estandar hecha con diferentes concentraciones de la sustancia pura.

**Métodos turbidimétricos :** En éstos métodos se utiliza un medio de cultivo líquido inoculado con el microorganismo en donde después de la inoculación se mide la turbidez producida por el crecimiento microbiano la cuál estará en función de la concentración de la sustancia en estudio. Esta turbidez se compara con una curva estandar hecha con concentraciones crecientes de la sustancia pura.

## 2.6 CONTROLES MICROBIOLÓGICOS

En los procesos industriales para obtener productos de microorganismos es necesario tener un buen control sobre los posibles contaminantes ya que estos afectan notablemente los rendimientos, por que compiten por los nutrientes del medio de cultivo con el microorganismo productor.

Los controles microbiológicos deben garantizar una calidad comercial del producto que se fabrica así como un buen rendimiento.

Para que una fermentación, en términos generales, se desarrolle en buenas condiciones es necesario sembrar el microorganismo en un medio estéril y hacer revisiones periódicas (tinciones de Gram) durante el tiempo de fermentación para estar seguros que el único microorganismo presente en el medio es el productor. En los procesos que se requiere aireación es necesario controlar la eficacia de los sistemas de filtración para esterilizar el aire y así evitar contaminaciones innecesarias.

## 2.7 CONSERVACION DE CEPAS

En este trabajo se ha utilizado el método de liofilización para la conservación de las cepas que integran esta subcolección por considerarse el método más apropiado para la conservación a largo plazo, y lo que más interesa es que este método evite la pérdida de las características que las hacen valiosas en las fermentaciones a nivel industrial. La conveniencia de la liofilización como método para preservar la mayoría de los microorganismos está bien establecida. Existen muchos reportes exitosos sobre el tema; la contaminación es relativamente fácil de evitar cuando la liofilización se hace apropiadamente y la viabilidad de los microorganismos se conserva por muchos años.

Es necesario llevar a cabo una serie de controles antes y después de la liofilización para estar seguros de que el proceso se realizó apropiada-

mente ; Antes de la liofilización se verifica la viabilidad y la pureza de las cepas, durante el proceso debe cuidarse la presión y la temperatura de la liofilización y después del proceso se comprueba la viabilidad de los microorganismos, la humedad residual, el sellado y el vacío de las ampollitas.

Todos estos datos se registran en tarjetas que para dicho fin existen en el Cepario de la Facultad de Química; además se anotan : El nombre de la cepa liofilizada, el medio de cultivo y las condiciones de rehidratación.

En el caso de esta subcolección se registraron también los medios y condiciones de cultivo para la obtención de los productos microbianos respectivos, así como para su cuantificación.

### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1 MATERIAL Y EQUIPO

##### Material :

Matraces volumétricos de	1000 ml
Matraces volumétricos de	500 ml
Matraces volumétricos de	100 ml
Matraces Erlenmeyer de	250 ml
Matraces Erlenmeyer de	100 ml
Vasos de precipitados de	100 ml
Vasos de precipitados de	50 ml
Pipetas graduadas de	10 ml
Pipetas graduadas de	5 ml
Pipetas graduadas de	1 ml
Pipetas volumétricas de	5 ml
Buretas graduadas de	50 ml
Tubos de cultivo de	16 X 150
Frascos para liofilizadora	
Ampolletas Pyrex	
Pinzas para bureta	
Asas de siembra	
Gradillas	
Pinzas	
Mechero	
Soporte	
Tripies	
Embudos	
Algodón	
Gasa	

Balanza granataria

Pipetas Pasteur

Cajas de petri

Equipo :

Baño de agua a temperatura constante

Campana de flujo laminar

Incubadora con agitación

Balanza analítica

Centrifuga

Incubadora

Espectrofotómetro

Microscopio

Horno

Autoclave

Liofilizadora

## 3.2 METODOS

### 3.2.1 METODOS PARA LA PRODUCCION Y CUANTIFICACION DE ACIDOS ORGANICOS

#### ACIDO CITRICO

Microorganismo : Aspergillus niger

#### Medio y Condiciones de Cultivo (24)

Medio de cultivo : Sacarosa	16	g
$KH_2PO_4$	0.015	g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.45	g
$NH_4NO_3$	0.33	g
KCl	0.03	g
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	0.3	g
leche descremada	0.05	g
$H_2O$ destilada	100	ml

#### Condiciones de cultivo :

Temperatura	28 ° C
Tiempo	10 días
Agitación	No requerida
pH	2

#### Procedimiento :

El medio de cultivo se prepara y se transfiere a matraces Erlenmeyer de 250 ml con tapón de algodón. Los matraces se esterilizan en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos. Se dejan enfriar y se inoculan con Aspergillus niger, se incuba a la temperatura y el tiempo indicados revisando periódicamente para detectar posibles contaminaciones. Transcurrido el tiempo de incubación se procede a valorar el ácido cítrico producido por Aspergillus niger (la producción se hace por triplicado poniendo 100 ml de medio en cada matraz).

Método para valorar el ácido cítrico (10) :

Titulación ácido-base : Tomar alícuotas de 5 ml del sobrenadante del medio de cultivo, adicionar alrededor de 20 ml de H<sub>2</sub>O destilada, agregar 3 gotas de indicador (fenoftaleína) y titular con NaOH exactamente 0.1 N.

$$g / l \text{ ácido cítrico} = \frac{V \cdot N \cdot eq}{A}$$

donde : V= Volumen de NaOH gastado en ml

N= Normalidad de la base (se usa 0.1 N)

eq=Equivalente químico del ácido cítrico

A= Alícuota en ml

P.M. del ácido cítrico = 192.12

eq de ácido cítrico = 90.06

#### ACIDO ACETICO

Microorganismo : Acetobacter suboxydans

Medio y Condiciones de Cultivo (2)

Medio de cultivo :	Glucosa	1.5	g
	Extracto de carne	0.02	g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05	g
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.07	g
	Citrato de potasio	0.007	g
	Pantotenato de calcio	0.001	g
	Etanol-H <sub>2</sub> O dest.2% (V/V)	100	ml

Condiciones de cultivo :

Temperatura	28° C
Tiempo	10-14 días
Agitación	Constante (150rpm)
pH	3.8

Procedimiento :

Preparar 300 ml de medio de cultivo y transferirlo a 3 matraces Erlenmeyer de 250 ml (100 ml en cada uno) con tapón de algodón. Ajustar el pH a 3.8 y esterilizar los matraces a 121° C durante 15 minutos. Enfriar el medio e inocular con Acetobacter suboxydans, incubar a la temperatura y a las condiciones mencionadas. Transcurrido el tiempo de incubación valorar el producto de la fermentación.

Método para valorar el ácido acético (10) :

Titulación ácido-base : Seguir el mismo procedimiento que para la titulación del ácido cítrico.

$$g / l \text{ de ácido acético} = \frac{V \cdot N \cdot eq}{A}$$

donde : V = Volumen de NaOH gastado en ml

N = Normalidad de la base (se use 0.1 N)

eq = Equivalente químico del ácido acético

A = Alicuota en ml

P.M. del ácido acético = 60.05

eq del ácido acético = 60.05

ACIDO LACTICO

Microorganismo : Lactobacillus delbreuckii

Medio y Condiciones de Cultivo (19)

Medio de cultivo :	Glucof:	10 g
	Extracto de levadura:	1.5 g
	Triptosa:	1 g
	CaCO <sub>3</sub>	1 g
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.5 g
	H <sub>2</sub> O destilado	100 ml

Condiciones de cultivo :

Temperatura	45° C
Tiempo	6-8 días
Agitación	No requerida
pH	5.5-6.0

Procedimiento :

Preparar 300 ml de medio de cultivo, ajustar el pH a 5.5, transferir a matracas Erlenmeyer de 250 ml con tapón de algodón, esterilizar a 121° C durante 15 minutos, enfriar e inocular con Lactobacillus delbreuckii, incubar en las condiciones mencionadas y transcurrido el tiempo de incubación valorar el ácido láctico producido.

Método para valorar el ácido láctico (10) :

Titulación ácido-base : Seguir el mismo procedimiento que para la valoración de ácido cítrico.

$$g / l \text{ de ácido láctico} = \frac{V \cdot N \cdot eq}{A}$$

donde : V = Volúmen de NaOH gastados en ml  
N = Normalidad de la sosa (se usa 0.1 N)  
eq = Equivalente químico de ácido láctico  
A = Alicuota en ml

P.M. de ácido láctico = 90.08

eq del ácido láctico = 90.08

### 3.2.2 METODOS PARA LA PRODUCCION Y CUANTIFICACION DE ENZIMAS

α - AMILASA :

Microorganismo : Bacillus subtilis

Medio y Condiciones de Cultivo (15) :

Medio de cultivo :	Caldo papa	20	g
	Peptona	0.3	g
	Extracto de maiz	4	g
	CaCO <sub>3</sub>	0.1	g
	KCl	0.15	g
	MgSO <sub>4</sub>	0.05	g
	CaCl <sub>2</sub>	0.01	g
	(NH) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.9	g
	H <sub>2</sub> O destilada	100	ml

Condiciones de cultivo :

Temperatura	37 ° C
Tiempo	5 días
Agitación	No requerida
pH	7.0-7.2

Procedimiento :

Preparar 300 ml de medio de cultivo, ajustar el pH a 7.0 y transferirlo a matraces Erlenmeyer de 250 ml (100 ml en cada uno), con tapón de algodón, esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos, enfriar el medio e inocular con Bacillus subtilis, incubar el tiempo y a las condiciones mencionadas.

Realizar controles microbiológicos (tinción de Gram) periódicamente durante el tiempo de incubación. Transcurrido este tiempo determinar la actividad de la enzima.

Método para determinar la actividad de α amilasa (18) :

En dos tubos de ensayo (control y experimental) poner 5 ml de una solución

de almidón al 1 % en buffer de acetatos 0.1 M pH = 5; en un tercer tubo (estandar) poner 5 ml de agua destilada. A cada tubo agregar 3 ml de buffer de acetatos 0.1 M pH = 5, un ml de  $\text{CaCl}_2$  0.5 M e incubar a 65 ° C; al tubo experimental agregar 1 ml del medio de fermentación e incubar todos los tubos 10 minutos; transcurrido el tiempo agregar a cada tubo 2 ml de HCl 1 N y a los tubos control y estandar 1 ml del medio de fermentación; después de mezclar tomar porciones de 0.2 ml y transferirlas a matraces volumétricos que contengan 0.5 ml de HCl 0.1 N y 40 ml de agua; agregar a cada matraz 0.1 ml de sol. iodo / ioduro (3 % KI + 0.3 %  $\text{I}_2$ ) y llevar hasta el aforo de 50 ml con agua. Leer en un espectrofotómetro a 610 nm.

La actividad de  $\alpha$ -amilasa se calcula de acuerdo a la fórmula :

$$\text{Actividad de } \alpha\text{-amilasa} = \frac{A - B}{A} \cdot C$$

donde : A = densidad óptica del control

B = densidad óptica del experimental

C = cantidad de almidón tomado originalmente en mg

#### PROTEASA

Microorganismo : Bacillus subtilis

Medio y Condiciones de Cultivo (26) :

Medio de cultivo :	Extracto de levadura	0.2 g
	Dextrosa	1 g
	Peptona	15 g
	Glucosa	0.4 g
	Harina de soya	0.24 g
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.1 g
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.3 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.01 g
	$\text{CaCl}_2$	0.02 g
	$\text{H}_2\text{O}$ destilada	100 ml

Condiciones de cultivo :

Temperatura	37 ° C
Tiempo	24 horas
Agitación	Constante (150rpm)
pH	7.0

Procedimiento :

Preparar 300 ml de medio de cultivo, ajustar el pH a 7.0, transferir a matraces Erlenmeyer de 250 ml (100 ml en cada uno) con tapón de algodón, esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente e inocular con Bacillus subtilis, incubar siguiendo las condiciones de cultivo, transcurrido el tiempo de incubación determinar la actividad proteolítica por el método de la digestión de caseína.

Método para determinar la actividad de la proteasa (26)

En dos tubos de ensayo de 16 X 150 mm poner 1 ml de la sol. de caseína y al tubo número 2, un ml del medio de fermentación, incubar los tubos a 37 ° C durante 5 minutos, transcurrido el tiempo agregar a cada tubo 2 ml de ácido tricloroacético 0.4 M y al tubo número 1 un ml del medio de fermentación; incubar a 37 ° C durante 20 minutos, filtrar, tomar un ml de filtrado de cada tubo; adicionar al filtrado 5 ml de una solución de carbonato de sodio 0.4 M y 1 ml de reactivo folin-fenol, mezclar e incubar durante 20 minutos a 37 ° C pasado este tiempo adicionar a cada tubo 1 ml de HCl 0.2 N, mezclar y leer en un espectrofotómetro a 660 nm. Hacer una curva estandar con concentraciones que vayan de 0 a 60 µg de tirosina.

Solución de caseína : 2 g de caseína en 20 ml de NaOH 1 N, agitar + 50 ml de H<sub>2</sub>O agitar; ajustar el pH con H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> diluido (1 parte de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 85 % en 3 partes de H<sub>2</sub>O), llevar a 100 ml con agua destilada.

## TRIPTOFANASA

Microorganismo : Proteus rettgerii ATCC 9918

Medio y Condiciones de Cultivo (12)

Medio de cultivo :	Triptona	1.0 g
	Extracto de levadura	0.5 g
	NaCl	0.5 g
	Glucosa	0.2 g
	H <sub>2</sub> O destilada	100 ml
	L-triptofano	1.5 g

Condiciones de cultivo :

Temperatura	37 ° C
Tiempo	20 horas
Agitación	Constante (150 rpm)
pH	9.0

Procedimiento :

Preparar 300 ml de medio de cultivo, ajustar el pH a 9.0 y repartir 100 ml en cada matraz Erlenmeyer de 250 ml con tapón de algodón; esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos. Enfriar el medio e inocular con la cepa de Proteus rettgerii ATCC 9918; incubar bajo las condiciones de cultivo y transcurrido el tiempo determinar la actividad de la enzima.

Método para determinar la actividad de la triptofenasa (12) :

Centrifugar cada matraz y recuperar las células, lavándolas dos veces con 10 ml de buffer de fosfatos. Resuspender las células en 5 ml de la mezcla de reacción, añadir 1 ml de tolueno y agitar vigorosamente durante 5 min., centrifugar las suspensiones y eliminar el tolueno. Tomar 500 µl de la fase acuosa de cada matraz y adicionar 100 µl de una solución de triptofano agitar el contenido de los tubos e incubar 30 minutos a 37 ° C. Añadir a cada tubo 3.4 ml de reactivo de Ehrlich, agitar y esperar el desarrollo de color durante 30 minutos, leer en un espectrofotómetro a 570 nm.

Trazar una curva estandar con concentraciones que vayan de 0 a 50 ug de una solución de indol. La actividad se reporta como ug indol / D.<sub>0</sub><sup>540</sup> ).

Mezcla de reacción : Glutatión reducido	6.4	mg
Fosfato de piridoxal	1.48	mg
Albumina sérica bovina	25	mg
Sol. amortiguadora de fosfatos	100	ml
Reactivo de Ehrlich : p-dimetilaminobenzaldehido	3.6	g
HCl concentrado	18	ml
Etenol absoluto hasta	100	ml

### 3.2.3 METODOS PARA LA PRODUCCION Y CUANTIFICACION DE VITAMINAS Y AMINOCIDOS

#### RIBOFLAVINA O VITAMINA B<sub>2</sub>

Microorganismo : Ashbya gossypii

Medio y Condiciones de Cultivo (33) :

Medio de cultivo : Glucosa	2.0	g
Agua de crecimiento de maíz	2.0	g
Extracto de levadura	0.1	g
H <sub>2</sub> O destilada	100	ml

Condiciones de cultivo :

Temperatura	28 ° C
Tiempo	5 días
Agitación	Constante (150 rpm)
pH	6.0-7.0

Procedimiento :

Preparar 300 ml de medio de cultivo, ajustar el pH a 6.0, transferir porciones de 100 ml a tres matraces Erlenmeyer de 250 ml con tapón de algodón, esterilizar en autoclave a 135 ° C durante 15 minutos, enfriar el medio a temperatura ambiente e inocular con Ashbya gossypii, incubar según las condicio-

nes de cultivo. Hacer controles microbiológicos periódicos durante el tiempo de cultivo; transcurrido el tiempo valorar la vitamina producida.

Método para valorar la riboflavina (14) :

Pesar con exactitud 0.1 g de riboflavina patrón de referencia, previamente seca a 105 °C por 2 horas; disolver en  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (1:250), calentando a 60-70 °C, enfriar; aforar a 1000 ml con agua destilada; tomar 10 ml y llevarlos a 50 ml con agua destilada para tener una concentración final de 0.2 mg / ml de riboflavina (Et). Tomar 5 ml del sobrenadante del medio de fermentación (Es).

Medir la absorbancia de 5 ml de cada una de las soluciones, usando  $\text{H}_2\text{O}$  como blanco, a 445 nm en una celdilla de 10 mm; inmediatamente después de la lectura añadir 0.02 g de hidrosulfito de sodio a cada tubo y medir nuevamente las absorbancias (Et' y Es').

Calcular los mg de riboflavina utilizando la siguiente fórmula :

$$\text{mg / ml riboflavina} = A \cdot \frac{\text{Et} - \text{Et}'}{\text{Es} - \text{Es}'}$$

donde : A = mg de riboflavina patrón de referencia

Et= absorbancia del patrón de referencia de riboflavina

Es= absorbancia del sobrenadante del medio de fermentación

Et'=absorbancia de Et + hidrosulfito de sodio

Es'=absorbancia de Es + hidrosulfito de sodio

#### CIANOCOBALAMINA O VITAMINA B<sub>12</sub>

Microorganismo : Streptomyces olivaceus

Medio y Condiciones de Cultivo (27) :

Medio de cultivo :	Glucosa	2.0	g
	Harina de soya	4.0	g
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.8	g

MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.05	g
CaCO <sub>3</sub>	0.5	g
CoCl <sub>2</sub>	8	ppm
H <sub>2</sub> O destilada	100	ml

Condiciones de cultivo :

Temperatura	28 ° C
Tiempo	5 días
Agitación	Constante (150 rpm)
pH	5.6-6.0

Procedimiento :

Preparar 300 ml de medio de cultivo, ajustar el pH a 5.6, transferir porciones de 100 ml a matraces Erlenmeyer de 250 ml con tapón de algodón, esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos, enfriar a temperatura ambiente e inocular con Streptomyces olivaceus. Incubar a la temperatura y bajo las condiciones antes mencionadas, haciendo controles microbiológicos periódicos. Transcurrido el tiempo de incubación valorar la cantidad de vitamina producida.

Método para valorar la cianocobalamina (16) :

Valoración microbiológica con Lectobacillus leichmannii ATCC 7830

PREPARACION DEL INOCULO : Preparar tres tubos de ensayo con 10 ml de caldo para inocular de vitamina B<sub>12</sub> (Difco D524-15) cuyos componentes son:

Jugo de tomate	100	ml
Peptona proteasa	7.5	g
Extracto de levadura	7.5	g
Dextrosa	10	g
Complejo sorbitan monooleato	0.1	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	g
H <sub>2</sub> O destilada	100	ml

Esterilizar a 121 ° C durante 15 minutos.

Inocular los tubos de ensayo con L.leichmanni ATCC 7830, incubar a 37° C por 8 horas, centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos y decantar, resuspender las células en 10 ml de solución salina isotónica estéril, y centrifugar en las mismas condiciones. Resuspender las células lavadas en solución salina estéril hasta llegar a una transmitancia de 80 a 90 % .

PREPARACION DEL ESTANDAR : Pesar 50 mg de cianocobalamina patrón de referencia, aforar a 100 ml con etanol, tomar 2 ml y llevarlos a 100 ml con agua destilada, tomar 2 ml y llevarlos a 100 ml con agua destilada para tener una concentración final de 0.2 µg / ml. Hacer una serie de tubos que vayan de 0.0 a 0.5 µg de cianocobalamina.

PREPARACION DEL PROBLEMA : Centrifugar los matraces y resuspender las células en solución salina estéril, volver a centrifugar y recuperar las células en 5 ml de solución salina estéril, añadir 1 ml de tolueno, agitar vigorosamente durante 5 minutos, centrifugar las suspensiones y eliminar el tolueno. Tomar 1 ml de la fase acuosa de cada matraz en tubos de ensayo.

Ajustar el volumen de cada tubo a 5 ml con agua destilada y adicionar 5 ml de medio basal para vitamina B<sub>12</sub> (Difco 0457-15) cuyos componentes son :

Casamino ácidos libres de vitaminas	15 g
Dextrosa	40 g
Acetato de sodio	20 g
Asparagina	0.2 g
Acido ascórbico	4 g
L-cistina	0.4 g
DL-triptofano	0.4 g
Sulfato de adenina	20 mg
Clorhidrato de guanina	20 mg
Uracilo	20 mg
Xantina	20 mg
Riboflavina	1 mg
Clorhidrato de tiamina	1 mg

Biotina	10	µg
Niacina	2	mg
Acido p-aminobenzoico	2	mg
Pantotenato de calcio	1	mg
Clorhidrato de piridoxina	4	mg
Clorhidrato de piridoxal	4	mg
Clorhidrato de piridoxamina	800	µg
Acido fólico	200	µg
Fosfato de potasio monobásico	1	g
Fosfato de sodio dibásico	1	g
Sulfato de magnesio	0.4	g
Cloruro de sodio	20	mg
Sulfato ferrosa	20	mg
Sulfato de manganeso	20	mg
Complejo de sorbitan monooleato	2	g
Agua destilada	1000	ml

Tapar los tubos con algodón y gasa, esterilizar a 121° C durante 5 minutos. Enfriar rápidamente a temperatura ambiente e inocular con una gota del inoculo, agitar e incubar a 37° C durante 18 horas. Transcurrido el tiempo refrigerar de 15 a 20 minutos y leer en un espectrofotómetro a 640 nm.

#### ACIDO GLUTAMICO

Microorganismo : Corynebacterium glutamicum

Medio y Condiciones de Cultivo (20) :

Medio de cultivo :	Sacarosa	2	g
	Urea	1	g
	Peptona	0.5	g
	MgSO <sub>4</sub>	0.15	g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.15	g

CaCO <sub>3</sub>	0.1 g
H <sub>2</sub> O destilada	100 ml

**Condiciones de cultivo :**

Temperatura	35 ° C
Tiempo	7 días
Agitación	Constante (150 rpm)
pH	8.0

**Procedimiento :**

Preparar 300 ml de medio de cultivo, ajustar el pH a 8.0, transferir a matraces Erlenmeyer de 250 ml porciones de 100 ml, tapar los matraces con algodón; esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos, enfriar a temperatura ambiente e inocular con la cepa productora. Incubar siguiendo las condiciones de cultivo. Durante el tiempo de incubación hacer controles microbiológicos periódicos. Transcurrido el tiempo de incubación valorar el producto de la fermentación.

**Método para valorar el ácido glutámico (11) :**

**PREPARACION DEL ESTANDAR :** Pesar 200 mg de ácido glutámico patrón de referencia en 100 ml de agua destilada, tomar 5 ml llevarlos a 100 ml con agua destilada para tener una concentración final de 100 µg / ml.

Preparar una serie de tubos que tengan concentraciones de ácido glutámico de 0 a 400 µg / ml.

**PREPARACION DEL PROBLEMA :** Tomar un ml del sobrenadante del medio de fermentación y hacer una dilución 1 : 100.

Ajustar el volumen de todos los tubos a 5 ml y agregar 5 ml del siguiente medio de cultivo :

Dextrosa	50	g
Acetato de sodio	600	mg
Cloruro de sodio	1	mg
Sulfato de magnesio	20	mg

Sulfato ferroso	1 mg
Fosfato de potasio monobásico	30.5 mg
Fosfato de potasio dibásico	44.2 mg
Fosfato de sodio monobásico	1.6 g
Fosfato de sodio dibásico	2.5 g
Biotina	0.5 µg
Acido p-aminobenzoico	4 µg
Pantotenato de calcio	40 µg
Riboflevina	20 µg
Clorhidrato de timina	20 µg
Nicotinamida	0.1 mg
Sulfato de adenina	5.4 mg
Clorhidrato de guanina	4.8 mg
Uracilo	3 mg
L-asparagina	0.5 mg
Clorhidrato de piridoxal	57.5 µg
DL-alanina	40 mg
L-arginina	48.4 mg
Cistina	10 mg
Histidina	12.4 mg
Agua destilada	1000 ml

Tapar todos los tubos con algodón y gasa, esterilizar 121 ° C durante 5 minutos; enfriar rápidamente hasta temperatura ambiente e inocular con 0.1 ml de una suspensión de L.mesenteroides ATCC 8042, incubar 24 horas a 35 ° C. Leer las absorbancias en un espectrofotómetro a 626 nm.

### 3.2.4 METODOS PARA LA PRODUCCION Y CUANTIFICACION DE ANTIBIOTICOS

#### PENICILINA

Microorganismo : Penicillium s.p.

Medio y Condiciones de Cultivo (32) :

Medio de cultivo : Glucosa	2	g
Almidón	1	g
Tripticasa	1	g
Extracto de carne	0.3	g
Agua de cocimiento de maíz	15	ml
Agua destilada	85	ml

Condiciones de cultivo :

Temperatura	20° C
Tiempo	5 días
Agitación	Constante
pH	6.0

Procedimiento :

Preparar 300 ml de medio de cultivo, ajustar el pH a 6.0; transferir 100 ml del medio a tres matraces Erlenmeyer de 250 ml con tapón de algodón, esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos, enfriar a temperatura ambiente e inocular con Penicillium s.p., incubar a la temperatura y condiciones estipulados, haciendo controles microbiológicos periódicos. Transcurrido el tiempo de incubación valorar la penicilina producida por la cepa.

Método para valorar penicilina (13) :

Método microbiológico con Staphylococcus aureus :

Sembrar 0.1 ml de un cultivo de 24 horas de S.aureus en 100 ml del medio

siguiente : Peptona	0.5	g
Extracto de levadura	0.15	g

Extracto de carne	0.15	g
Glucosa	0.10	g
NaCl	0.35	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.365	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.132	g
H <sub>2</sub> O destilada	100	ml

Esterilizar a 121° C durante 15 minutos.

Incubar 24 horas a 35° C.

PREPARACION DEL ESTANDAR : Pesar 0.1 g de penicilina G sódica y llevar a 50 ml con H<sub>2</sub>O destilada para tener una concentración final de 2 mg / ml. En tubos de 16 X 150 mm preparar una curva que vaya de 0.0 a 3.8 mg de penicilina.

PREPARACION DEL PROBLEMA : Tomar un ml del medio de fermentación y hacer una dilución 1 : 100.

Ajustar el volúmen de todos los tubos a 10 ml con el medio de cultivo inoculado con S.aureus. Preparar un tubo "blanco" que contenga 10 ml del medio de cultivo sin inocular.

Colocar todos los tubos en baño María a 35° C de 2-4 horas. El tiempo exacto del periodo de incubación se determinara observando el desarrollo del tubo 3 que contiene la solución óptima. Retirar los tubos del baño María y agregar a cada uno 0.5 ml de formaldehído al 12 %. Leer la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm.

#### POLIMIXINA

Microorganismo : Bacillus polymyxa

Medio y Condiciones de Cultivo (23) :

Medio de cultivo :	Sacarosa	3	g
	Extracto de levadura	0.5	g
	Sulfato de amonio	2	g
	Carbonato de calcio	0.3	g

Cloruro de sodio	0.05	g
Biotina	1	ug
Agua destilada	100	ml

Condiciones de cultivo :

Temperatura	28 ° C
Tiempo	72 horas
Agitación	Constante (150 rpm)
pH	7.8

Procedimiento :

Preparar 300 ml de medio de cultivo, ajustar el pH a 7.8; transferir porciones de 100 ml a tres matraces Erlenmeyer de 250 ml con tapón de algodón, esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos, enfriar el medio hasta temperatura ambiente e inocular con Bacillus polymyxa, incubar siguiendo las condiciones de cultivo. Valorar la polimixina producida.

Método para valorar la polimixina (13) :

Utilizar el mismo medio de cultivo que para la valoración de penicilina; una vez estéril inocular con 0.1 ml de un cultivo de 24 horas de E.coli e incubar a 37 ° C durante 24 horas .

PREPARACION DEL ESTANDAR : Pesar 0.1 de polimixina B patrón de referencia; disolver en 100 ml de una solución amortiguadora de fosfatos pH = 6.0, tomar 5 ml y aforar a 100 ml con la misma solución amortiguadora para tener una concentración final de 50 µg / ml. De esta solución hacer una serie de tubos que contengan concentraciones de polimixina B de 0.0 a 80 µg.

PREPARACION DEL PROBLEMA : Tomar un ml del sobrenadante del medio de fermentación y colocarlo en un tubo.

Ajustar el volumen de todos los tubos a 10 ml con el medio inoculado con E.coli y seguir el mismo procedimiento que para la valoración de penicilina.

## ESTREPTOMICINA

Microorganismo Streptomyces griseus

Medio y Condiciones de Cultivo (31) :

Medio de cultivo : Glucosa	1	g
Peptona	0.5	g
Extracto de levadura	0.5	g
Cloruro de sodio	0.5	g
Agua destilada	100	ml

Condiciones de cultivo :

Tiempo	15 días
Temperatura	28 ° C
Agitación	No requerida
pH	6.5-7.0

Procedimiento :

Preparar 300 ml de medio de cultivo; ajustar el pH y transferir a matraces Erlenmeyer de 250 ml con tapón de algodón, esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente e inocular con S.griseus.

Incubar los matraces según las condiciones de cultivo y realizar controles microbiológicos periódicos durante la fermentación. Valorar la estreptomicina producida por la cepa.

Método para valorar estreptomicina (13) :

Valoración microbiológica con Klebsiella pneumoniae .

Utilizar el mismo medio de cultivo que para la valoración de penicilina, una vez estéril inocular con 0.1 ml de un cultivo de 24 horas de K.pneumoniae, e incubar 24 horas a 37° C.

PREPARACION DEL ESTANDAR : Pesar 0.1 g de sulfato de estreptomicina; llevar a 100 ml con agua destilada, tomar 1 ml y llevar a 50 ml con agua destilada para tener una concentración final de 20 µg / ml. De esta solución hacer una serie de tubos con concentraciones que vayan de 0.0 a 40 µg.

PREPARACION DEL PROBLEMA : Tomar un ml del medio de fermentación y hacer una dilución 1 :10; tomar un ml de esta dilución y ponerla en un tubo. Ajustar el volumen de todos los tubos a 10 ml con el medio inoculado con K.pneumoniae y seguir el mismo procedimiento que para la valoración de la penicilina.

### 3.2.5 METODO PARA LA PRODUCCION Y CUANTIFICACION DE ETANOL

Microorganismo : Saccharomyces cerevisiae

Medio y Condiciones de Cultivo (33) :

Medio de cultivo : Glucosa	1	g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.2	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.04	g
Extracto de levadura	0.2	g
Agua destilada	100	ml

Condiciones de cultivo :

Temperatura	28 ° C
Tiempo	50 horas
Agitación	No requerida
pH	4.0

Procedimiento :

Preparar 300 ml de medio de cultivo, ajustar el pH a 4.0; transferir porciones de 100 ml a tres matraces Erlenmeyer de 250 ml con tapón de algodón, esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos, enfriar a temperatura ambiente e inocular con S.cerevisiae. Incubar según las condiciones de cultivo. Transcurrido el tiempo de fermentación valorar la producción de etanol

Método para valorar etanol (7) :

Centrifugar el medio de fermentación para separar las células; medir exactamente 50 ml del sobrenadante libre de microorganismos, destilar y recuperar las fracciones que destilan entre 70 ° C y 95 ° C. El destilado obtenido se afora a 50 ml con agua bidestilada y se determina la gravedad específica con un picnómetro: Poniendo a peso constante el picnómetro, llenarlo con agua bidestilada y pesarlo. Vaciar el agua, secar perfectamente, adicionar el destilado y pesar nuevamente.

La gravedad específica se obtiene con la siguiente fórmula :

$$Ge = \frac{Pd}{Pa}$$

donde : Ge = Gravedad específica

Pd = Peso del destilado

Pa = Peso del agua bidestilada

Determinar el % de etanol utilizando la tabla respectiva.

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1 RESULTADOS DE LA VALORACION DE ACIDOS ORGANICOS

###### ACIDO CITRICO :

Se probaron ocho diferentes cepas de Aspergillus niger disponibles en el Cepario de la Facultad de Química. A continuación se reportan los resultados obtenidos de la producción de ácido cítrico de cada cepa.

El rendimiento de ácido cítrico se reporto en base a la reacción estequiométrica de glucosa a ácido cítrico.

Reacción :



Glucosa en el medio de cultivo = 32 g

$$1 \text{ Mol glucosa} \text{ --- } 180 \text{ g}$$

$$x \text{ --- } 32 \text{ g} \quad x = 0.177 \text{ Moles}$$



$$1 \text{ Mol ácido cítrico --- } 192.12 \text{ g}$$

$$0.177 \text{ Moles --- } x \quad x = 34.00 \text{ g}$$

Rendimiento teórico : 34.00 g

###### A. niger C<sub>5</sub>

Matraz	Vol (ml)
1	4.2
2	3.9
3	4.3

$$\bar{x} = 4.13 \text{ ml}$$

$$g / l \text{ ácido cítrico} = \frac{V \cdot N \cdot eq}{A} = \frac{4.13 \text{ ml} \cdot 0.1 \cdot 96.06}{5 \text{ ml}} = 7.93$$

Rendimiento ácido cítrico :

$$34.00 \text{ g} \text{ --- } 100 \%$$

$$7.93 \text{ g} \text{ --- } X \quad X = 23.32 \%$$

A.niger C<sub>6</sub>

Matraz	Vol (ml)
1	3.3
2	3.4
3	3.4

$$\bar{x} = 3.36 \text{ ml}$$

$$g / l \text{ ácido cítrico} = 6.45$$

$$\text{Rendimiento ácido cítrico} = 18.97 \%$$

A.niger C<sub>8</sub>

Matraz	Vol (ml)
1	2.1
2	2.0
3	2.1

$$\bar{x} = 2.06 \text{ ml}$$

$$g / l \text{ ácido cítrico} = 3.95$$

$$\text{Rendimiento ácido cítrico} = 11.61 \%$$

A.niger EM-1

Matraz	Vol(ml)
1	3.7
2	3.9
3	3.9

$$\bar{x} = 3.85 \text{ ml}$$

g / l ácido cítrico = 7.35

Rendimiento ácido cítrico = 21.61 %

A.niger EM-2

Matraz	Vol(ml)
1	7.1
2	7.0
3	7.1

$$\bar{x} = 7.06 \text{ ml}$$

g / l ácido cítrico = 13.56

Rendimiento ácido cítrico = 39.88 %

A.niger EM-3

Matraz	Vol (ml)
1	8.1
2	8.1
3	7.9

$$\bar{x} = 8.03 \text{ ml}$$

g / l ácido cítrico = 15.42

Rendimiento ácido cítrico = 45.35 %

A.niger 2040

Matraz	Vol (ml)
1	6.2
2	6.1
3	6.2

$$\bar{x} = 6.16 \text{ ml}$$

g / l ácido cítrico = 11.83

Rendimiento ácido cítrico = 34.79 %

g / l ácido cítrico = 7.35

Rendimiento ácido cítrico = 21.61 %

A.niger EM-2

Matraz	Vol(ml)
1	7.1
2	7.0
3	7.1

$$\bar{x} = 7.06 \text{ ml}$$

g / l ácido cítrico = 13.56

Rendimiento ácido cítrico = 39.88 %

A.niger EM-3

Matraz	Vol (ml)
1	8.1
2	8.1
3	7.9

$$\bar{x} = 8.03 \text{ ml}$$

g / l ácido cítrico = 15.42

Rendimiento ácido cítrico = 45.35 %

A.niger 2040

Matraz	Vol (ml)
1	6.2
2	6.1
3	6.2

$$\bar{x} = 6.16 \text{ ml}$$

g / l ácido cítrico = 11.83

Rendimiento ácido cítrico = 34.79 %

A.niger

Matraz	Vol (ml)
1	6.5
2	6.4
3	6.5

$$\bar{x} = 6.46 \text{ ml}$$

g / l ácido cítrico = 12.35

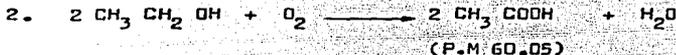
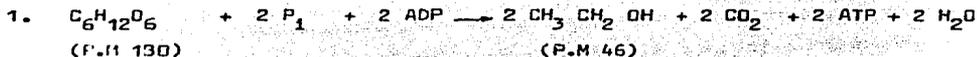
Rendimiento ácido cítrico = 36.32 %

<u>A.niger</u>	Rendimiento (%)
C <sub>5</sub>	23.32
C <sub>6</sub>	18.97
C <sub>8</sub>	11.61
EM-1	21.61
EM-2	39.88
EM-3	45.35
2040	34.79
<u>A.niger</u>	36.32

ACIDO ACETICO :

Se probó una cepa de Acetobacter suboxydans productora de ácido acético disponible en el Cepario de la Facultad de Química; a continuación se reportan los resultados obtenidos de la producción de este ácido por la cepa. El rendimiento de ácido acético se reportó en base a la reacción estequiométrica de glucosa a ácido acético.

Reacción :



Glucosa en el medio de cultivo = 1.5 g

Etanol en el medio de cultivo = 2.0 g

$$1. \quad \begin{array}{l} 1 \text{ Mol glucosa} \text{ --- } 180 \text{ g} \\ X \text{ --- } 1.5 \text{ g} \end{array} \quad X = 0.0083 \text{ Moles}$$

$$0.0083 \text{ Moles glucosa} \longrightarrow 0.0166 \text{ Moles ácido acético}$$

$$\begin{array}{l} 1 \text{ Mol ácido acético} \text{ --- } 60.05 \text{ g} \\ 0.0166 \text{ Moles} \text{ --- } X \end{array} \quad X = 0.9968 \text{ g}$$

$$2. \quad \begin{array}{l} 1 \text{ Mol etanol} \text{ --- } 46 \text{ g} \\ X \text{ --- } 2 \text{ g} \end{array} \quad X = 0.0434 \text{ Moles}$$

$$0.0434 \text{ Moles etanol} \longrightarrow 0.0434 \text{ Moles ácido acético}$$

$$\begin{array}{l} 1 \text{ Mol ácido acético} \text{ --- } 60.05 \text{ g} \\ 0.0434 \text{ Moles} \text{ --- } X \end{array} \quad X = 2.6061 \text{ g}$$

$$\text{Rendimiento teórico} = 0.9968 \text{ g} + 2.6061 \text{ g} = 3.6029 \text{ g}$$

A. suboxydans

Matraz	Vol (ml)
1	2.6
2	2.5
3	2.6

$$\bar{x} = 2.56 \text{ ml}$$

$$g / l \text{ ácido acético} = \frac{V \cdot N \cdot eq}{A} = \frac{2.56 \text{ ml} \cdot 0.1 \cdot 60.05}{5 \text{ ml}} = 3.07$$

Rendimiento de ácido acético :

$$3.6029 \text{ g} \text{ --- } 100 \%$$

$$3.07 \text{ g} \text{ --- } x \quad x = 85.20 \%$$

ACIDO LACTICO :

Se probó una cepa de Lactobacillus delbreuckii productora de ácido láctico disponible en el Cepario de la Facultad de Química. A continuación se reportan los resultados de la producción de ácido por esta cepa.

El rendimiento de ácido láctico se reporta en base a la reacción estequiométrica de glucosa a ácido láctico.

Reacción :



Glucosa en el medio de cultivo = 10 g

$$1 \text{ Mol glucosa} \text{ --- } 180 \text{ g}$$

$$x \text{ --- } 10 \text{ g} \quad x = 0.0555$$

0.0555 Moles glucosa  $\longrightarrow$  0.111 Moles ácido láctico

$$1 \text{ Mol ácido láctico} \text{ --- } 90.08 \text{ g}$$

$$0.111 \text{ Moles} \text{ --- } x \quad x = 9.99 \text{ g}$$

Rendimiento teórico = 9.99 g

L.delbreuckii

Matraz	Vol (ml)
1	7.7
2	7.9
3	7.7

$$\bar{x} = 7.76 \text{ ml}$$

$$\text{g / l ácido láctico} = \frac{V \cdot N \cdot \text{eq}}{A} = \frac{7.76 \text{ ml} \cdot 0.1 \cdot 90.08}{5 \text{ ml}} = 6.99$$

Rendimiento de ácido láctico :

$$9.99 \text{ g} \text{ ——— } 100 \%$$

$$6.99 \text{ g} \text{ ——— } X \quad X = 69.96 \%$$

Cepa	Rendimiento (%)
<u>L.delbreuckii</u>	69.96

#### 4.2 RESULTADOS DE LA VALORACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

AMILASA :

Se probaron dos cepas de Bacillus subtilis amilasa positivas disponibles en el Ceperio de la Facultad de Química. A continuación se reportan los resultados obtenidos de la actividad de amilasa de cada cepa.

##### B.subtilis C<sub>2</sub>

Matraz	Absorbancia
1A	0.20
2A	0.25
3A	0.20
1B	0.10
2B	0.10
3B	0.10

$$\bar{A} = 0.216$$

$$\bar{B} = 0.10$$

$$C = 50 \text{ mg de almidón}$$

$$\text{Actividad de } \alpha\text{-amilasa (unidades / mg)} = \frac{A - B}{A} \cdot C = \frac{0.216 - 0.10}{0.216} \cdot 50 = 26.85$$

##### B.subtilis ATCC 6633

Matraz	Absorbancia
1A	0.50
2A	0.55
3A	0.55
1B	0.15
2B	0.10
3B	0.10

$$\bar{A} = 0.516$$

$$\bar{B} = 0.116$$

$$C = 50 \text{ mg de almidón}$$

$$\text{Actividad de } \alpha\text{-amilasa (unidades / mg)} = \frac{A - B}{A} \cdot C = \frac{0.516 - 0.116}{0.516} \cdot 50 = 38.76$$

<u>B.subtilis</u>	Actividad de $\alpha$ -amilasa (unidades / mg)
C <sub>2</sub>	26.85
ATCC 6633	38.76

#### PROTEASA

Se probaron cuatro cepas de B.subtilis en gelatina nutritiva y en agar leche descremada para determinar si eran proteolíticas; tres resultaron proteasa + por lo que se sembraron en el medio para producción de proteasa. A continuación se reportan los resultados obtenidos de la actividad proteolítica de las cepas :

Curva estandar de tirosina :

Tubo	Absorbancia	Conc. ( $\mu$ g / ml)
1	0.13	10
2	0.25	20
3	0.29	30
4	0.38	40
5	0.48	50
6	0.55	60

#### B.subtilis 85-Y-1021

Matraz	Absorbancia
1	0.21
2	0.205
3	0.205

$$\bar{x} = 0.206$$

B.subtilis ATCC 6051

Matraz	Absorbancia
1	0.24
2	0.235
3	0.24

$$\bar{x} = 0.238$$

B.subtilis C<sub>1</sub>

Matraz	Absorbancia
1	0.25
2	0.25
3	0.25

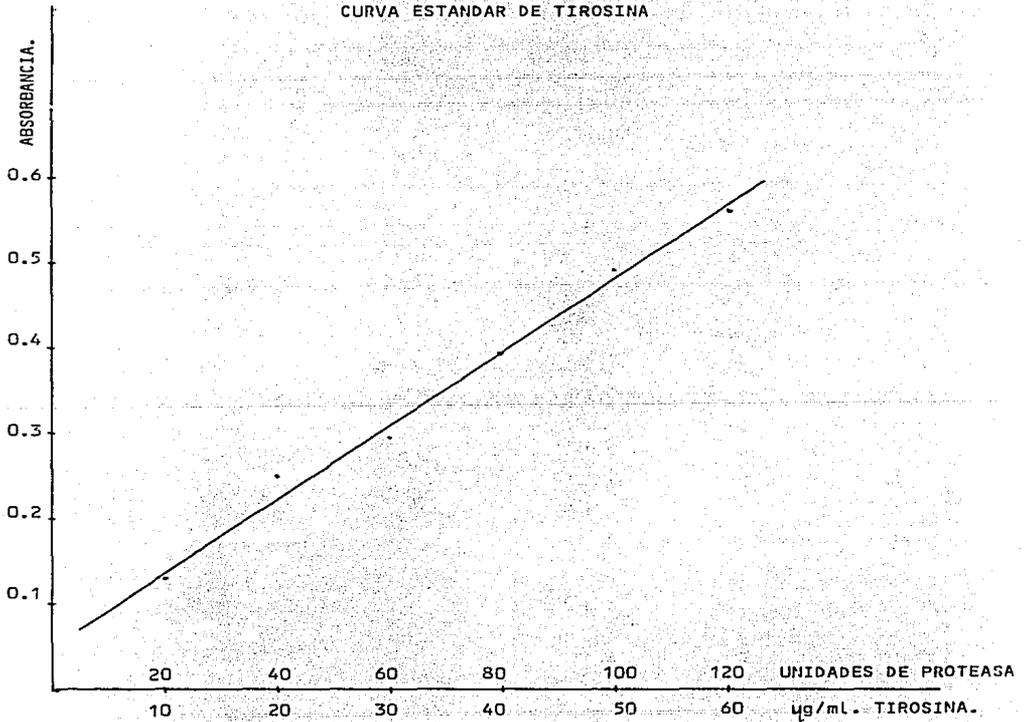
$$\bar{x} = 0.25$$

<u>B.subtilis</u>	Actividad proteolítica (unidades)
85-Y-1021	37.0
ATCC 6051	43.0
C <sub>1</sub>	47.0

Una unidad de actividad proteolítica es definida como la cantidad de enzima que produce fragmentos solubles dando un color azul equivalente a 0.5 µg de tirosina, bajo las condiciones del experimento.

P R O T E A S A

CURVA ESTANDAR DE TIROSINA



TRIPTOFANASA :

Se probó una cepa de Proteus rettgerii ATCC 9918 para la producción de triptofanasa disponible en el Cepario de la Facultad de Química; a continuación se reporta el resultado de la actividad enzimática de la cepa.

Curva estándar de indol :

Tubo	Absorbancia	Conc. ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )
1	0.05	2
2	0.08	4
3	0.11	6
4	0.14	8
5	0.17	10

P. rettgerii ATCC 9918

Matraz	Absorbancia
1	0.125
2	0.125
3	0.125

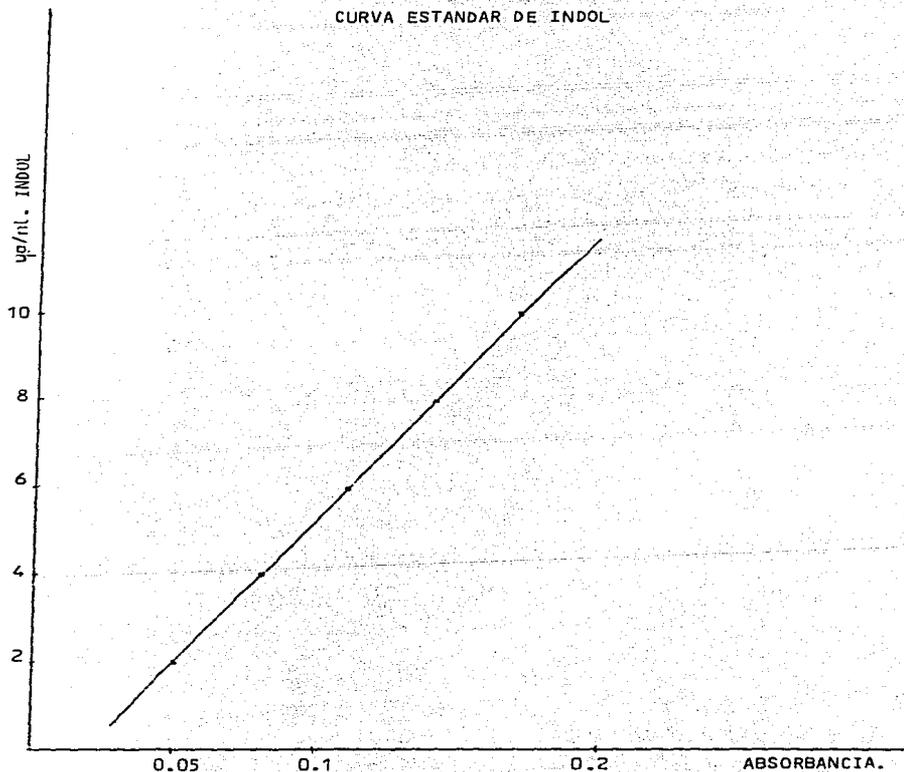
$$x = 0.125$$

Actividad en  $\mu\text{g}$  de indol / D.O-540 = 7.1

Cepa	Actividad ( $\mu\text{g}$ indol / D.O <sub>540</sub> )
<u>P. rettgerii</u> ATCC 9918	7.1

T R I P T O F A N A S A

CURVA ESTANDAR DE INDOL



#### 4.3 RESULTADOS DE LA VALORACION DE VITAMINAS Y AMINOCIDOS

##### RIBOFLAVINA :

Se probó una cepa de Ashbya gossypii productora de riboflavina, disponible en el Cepario de la Facultad de Química. A continuación se reporta el resultado obtenido de la producción de riboflavina por la cepa :

Matraz	Absorbancia	Matraz	Absorbancia (con hidrosulfito)
Et	1.4	Et'	0.74
Es <sub>1</sub>	0.92	Es' <sub>1</sub>	0.75
Es <sub>2</sub>	0.92	Es' <sub>2</sub>	0.73
Es <sub>3</sub>	0.92	Es' <sub>3</sub>	0.75

$$\bar{E}_s = 0.92$$

$$\bar{E}_s' = 0.743$$

$$\text{riboflavine} = A \cdot \frac{Et - Et'}{Es - Es'} = 0.2 \cdot \frac{(1.4 - 0.74)}{(0.92 - 0.743)} = 0.74 \text{ mg / ml}$$

Cepa	Riboflavina (mg / ml)
<u>A.gossypii</u>	0.74

##### CIANOCOBALAMINA :

Se probó una cepa de Streptomyces olivaceus productora de vitamina B<sub>12</sub>. La vitamina B<sub>12</sub> se valoró por método microbiológico con L. leichmannii ATCC 7830. A continuación se reporta el resultado obtenido de la producción de vitamina B<sub>12</sub> por la cepa.

Curva estandar de cianocobalamina :

Tubo	Transmitancia (%)	Conc. ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )
1	blanco	0.0
2	77	0.1
3	69	0.2
4	64	0.3
5	60	0.4
6	56	0.5

S.olivaceus

Matraz	Transmitancia (%)
1	62.5
2	62.5
3	62.5

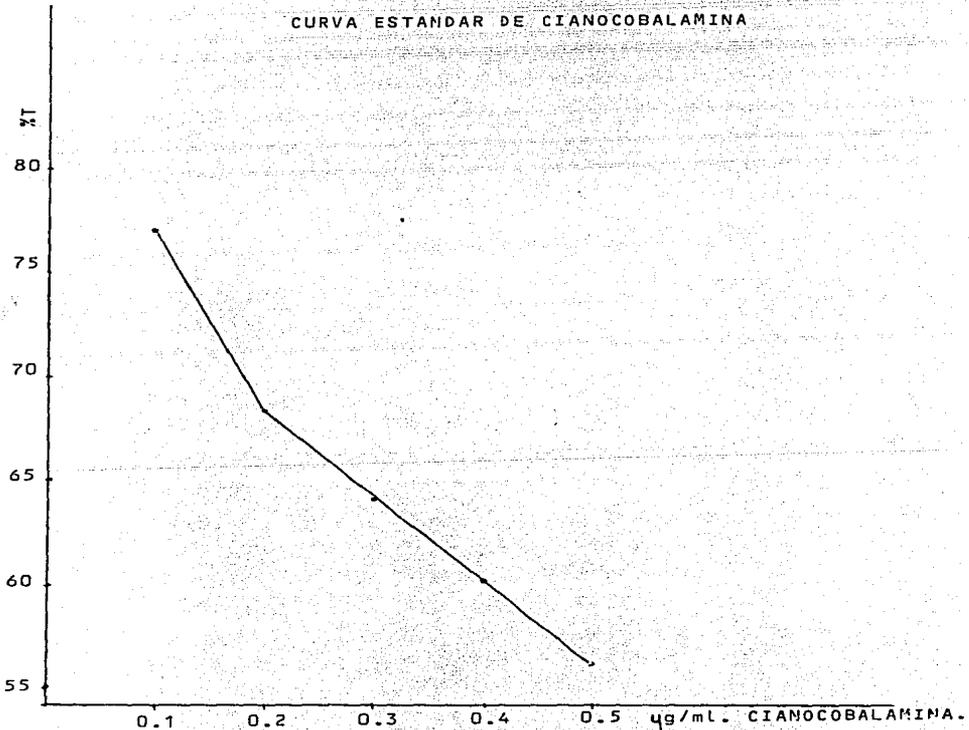
$$\bar{x} = 62.5$$

Concentración de cianocobalamina = 0.34  $\mu\text{g} / \text{ml}$

Cepa	Cianocobalamina ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )
<u>S.olivaceus</u>	0.34

V I T A M I N A B<sub>12</sub>

CURVA ESTANDAR DE CIANOCOBALAMINA



ACIDO GLUTAMICO :

Se probó una cepa de Corynebacterium glutamicum productora de ácido glutámico disponible en el Cepario de la Facultad de Química. El siguiente es el resultado obtenido de la producción de el aminoácido por esta cepa :

Curva estandar de ácido glutámico :

Tubo	Absorbancia	Conc. ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )
1	blanco	0.0
2	0.13	50.0
3	0.15	100.0
4	0.18	150.0
5	0.20	200.0
6	0.225	250.0
7	0.25	300.0
8	0.28	350.0
9	0.30	400.0

C. glutamicum

Matraz (dil 1:100)	Absorbancia
1	0.235
2	0.235
3	0.235

$$\bar{x} = 0.235$$

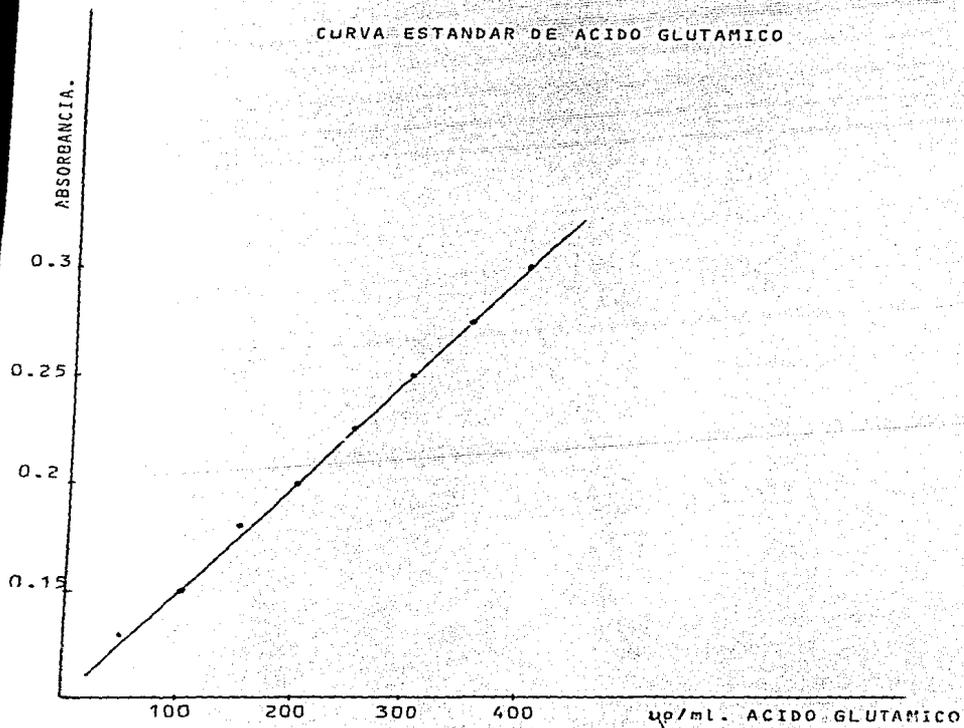
Concentración de ácido glutámico =  $275 \mu\text{g} / \text{ml}$

$275 \mu\text{g} / \text{ml} \cdot 10 \text{ (dil. 1:100)} = 27500 \mu\text{g} / \text{ml} = 27.5 \text{ mg} / \text{ml}$

Cepa	Ac. glutámico ( $\text{mg} / \text{ml}$ )
<u>C. glutamicum</u>	27.5

A C I D O   G L U T A M I C O

CURVA ESTANDAR DE ACIDO GLUTAMICO



#### 4.4 RESULTADOS DE LA VALORACION DE ANTIBIOTICOS

##### PENICILINA :

Prueba par la selección de cepas productoras de penicilina :

Se probaron ocho cepas de Penicillium s.p disponibles en el Cepario de la Facultad de Química, en un medio que permite el desarrollo de esta cepa y del microorganismo de prueba : S.aureus. El medio utilizado es una combinación de agar papa-dextrosa y agar nutritivo en partes iguales.

La prueba se realizó en cajas de petri con el medio sólido. En un extremo de la caja se sembró por estría la cepa de Penicillium s.p en estudio, se dejaron las cajas en incubación durante 5 días a 28° C; transcurrido este tiempo se sembró en estrías perpendiculares el microorganismo de prueba y se incubó 18 horas a 37° C. Al cabo de este tiempo se observó si había o no inhibición de S.aureus.

De las ocho cepas probadas cuatro inhibieron el desarrollo de S.aureus en una forma notable, estas cuatro cepas ( C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>7</sub>, y C<sub>8</sub> ) se sembraron en el medio para la producción de penicilina.

##### Curva estandar de penicilina :

Tubo	Absorbancia	Conc.(mg)
1	0.40	2.4
2	0.31	2.6
3	0.24	3.0
4	0.12	3.4
5	0.06	3.8

Penicillium s.p C<sub>3</sub>

Matraz (dil. 1:100)	Absorbancia
1	0.21
2	0.22
3	0.22

$$\bar{x} = 0.216$$

Concentración de penicilina = 3.0 mg

En 3.0 mg • 100 (dil. 1:100) = 300 mg / ml

Penicillium s.p C<sub>4</sub>

Matraz (dil. 1:100)	Absorbancia
1	0.23
2	0.22
3	0.24

$$\bar{x} = 0.23$$

Concentración de penicilina = 2.95 mg

En 2.95 mg • 100 (dil. 1:100) = 295 mg / ml

Penicillium s.p C<sub>7</sub>

Matraz (dil 1:100)	Absorbancia
1	0.29
2	0.29
3	0.29

$$\bar{x} = 0.29$$

Concentración de penicilina = 2.75 mg

en 2.75 mg • 100 ( dil 1 :100) = 275 mg / ml

Penicillium s.p C<sub>8</sub>

Matraz (dil 1:100)	Absorbancia
1	0.20
2	0.20
3	0.19

$$\bar{x} = 0.196$$

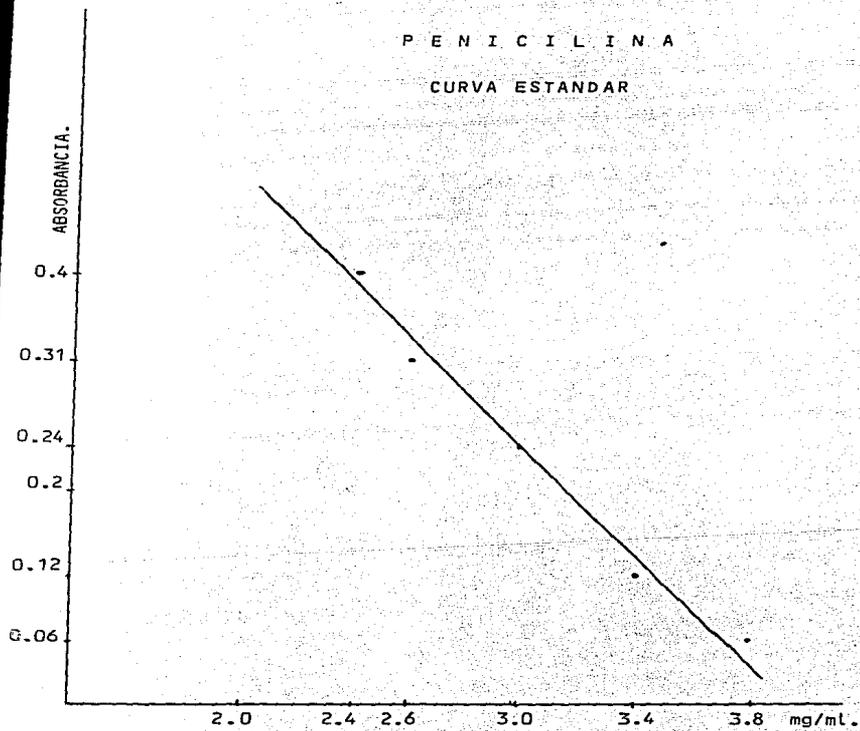
Concentración de penicilina = 3.2 mg

En 3,2 mg - 100 (dil 1:100) = 320 mg / ml

<u>Penicillium s.p</u>	Penicilina (mg / ml)
C <sub>3</sub>	300
C <sub>4</sub>	295
C <sub>7</sub>	275
C <sub>8</sub>	320

P E N I C I L I N A

CURVA ESTANDAR



POLIMIXINA :

Se probó una cepa de Bacillus polymyxa productora de polimixina disponible en el Laboratorio de la Facultad de Química. A continuación se reporta el resultado de la producción de polimixina por la cepa :

Curva estandar de polimixina :

Tubo	Absorbancia	Conc. ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )
1	blanco	0.0
2	0.51	12.5
3	0.46	25.0
4	0.42	37.5
5	0.37	50.0
6	0.32	62.5
7	0.28	75.0

B. polymyxa

Matraz	Absorbancia
1	0.35
2	0.35
3	0.35

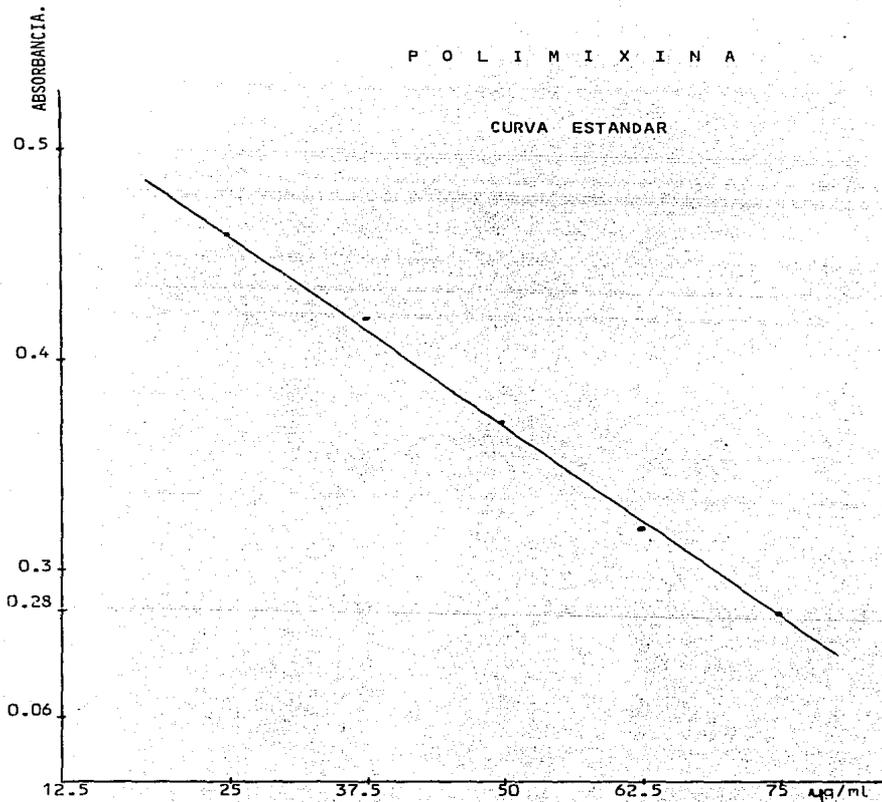
$$\bar{x} = 0.35$$

Concentración de polimixina = 55  $\mu\text{g} / \text{ml}$

Cepa	Polimixina ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )
<u>B. polymyxa</u>	55

P O L I M I X I N A

CURVA ESTANDAR



ESTREPTOMICINA :

Se probó una cepa de Streptomyces griseus productora de estreptomicina disponible en el Ceperio de la Facultad de Química. Los resultados siguientes corresponden a la curva estandar de estreptomicina y a la producción de éste antibiótico por la cepa :

Curva estandar de estreptomicina :

Tubo	Absorbancia	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	blanco	0.0
2	0.31	24.0
3	0.30	26.0
4	0.28	30.0
5	0.265	33.5
6	0.25	37.5

S. griseus

Matraz (dil. 1:10)	Absorbancia
1	0.30
2	0.295
3	0.30

$$\bar{x} = 0.298$$

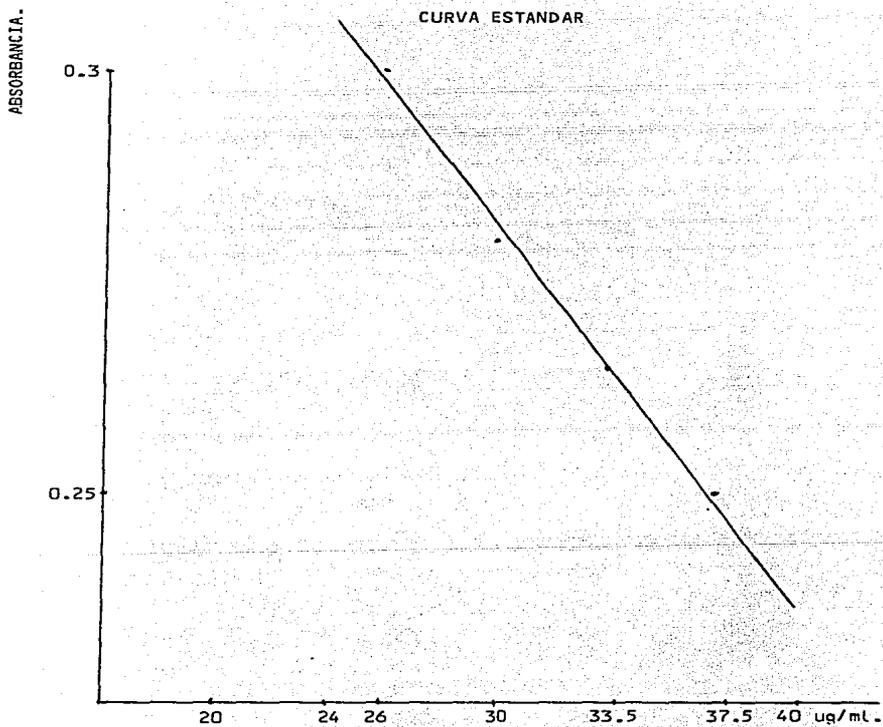
Concentración de estreptomicina = 26.5  $\mu\text{g}$

26.5  $\mu\text{g}$  \* 10 (dil. 1:10) = 265  $\mu\text{g}$  / ml = 0.265 mg / ml

Cepa	Estreptomicina (mg / ml)
<u>S. griseus</u>	0.265

ESTREPTOMICINA

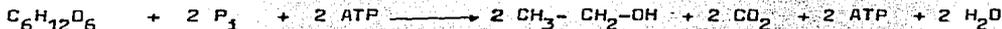
CURVA ESTANDAR



#### 4.5 RESULTADOS DE LA VALORACION DE ETANOL

Se probaron seis diferentes cepas de Saccharomyces cerevisiae disponibles en el Departamento de la Facultad de Química. A continuación se reportan los resultados obtenidos de la producción de etanol de cada cepa.

El porcentaje de etanol se determinó con la gravedad específica utilizando las tablas recopiladas por el Departamento Nacional de Estándares publicada en Bull. Natl. Bur. Std. 9(3)(1913) y republicada por el ADAC (1984)



##### S.cerevisiae C<sub>1</sub>

$$G_e = \frac{P_d}{P_a} = \frac{10.1147}{10.2710} = 0.9848$$

Etanol = 11.36 %

##### S.cerevisiae C<sub>2</sub>

$$G_e = \frac{P_d}{P_a} = \frac{9.9744}{10.0313} = 0.9943$$

Etanol = 3.90 %

##### S.cerevisiae C<sub>3</sub>

$$G_e = \frac{P_d}{P_a} = \frac{9.9986}{10.0954} = 0.9904$$

Etanol = 6.80 %

##### S.cerevisiae C<sub>4</sub>

$$G_e = \frac{P_d}{P_a} = \frac{10.0150}{10.1064} = 0.9909$$

Etanol = 6.41 %

S.cerevisiae C<sub>5</sub>

$$Ge = \frac{Pd}{Pa} = \frac{10.1989}{10.3392} = 0.9864$$

Etanol = 10.03 %

S.cerevisiae C<sub>7</sub>

$$Ge = \frac{Pd}{Pa} = \frac{10.1977}{10.2759} = 0.9971$$

Etanol = 1.95 %

<u>S.cerevisiae</u>	% de etanol
C <sub>1</sub>	11.36
C <sub>2</sub>	3.90
C <sub>3</sub>	6.80
C <sub>4</sub>	6.41
C <sub>5</sub>	10.03
C <sub>7</sub>	1.95

#### 4.6 RESULTADOS DE LA LIOFILIZACION

Antes y después de la liofilización se determinó la viabilidad de las cepas que forman esta subcolección con los siguientes resultados :

Acetobacter suboxydans, Lactobacillus delbreuckii, Bacillus subtilis ATCC 5633, Bacillus subtilis ATCC 6051 y C<sub>1</sub>, Corynebacterium glutamicum, Bacillus polymyxa colonias incontables hasta la dilución de 10<sup>-12</sup>.

Penicillium s.p C<sub>3</sub> y C<sub>8</sub> colonias incontables hasta la dilución de 10<sup>-10</sup>.

Streptomyces griseus, Streptomyces olivaceus, Proteus rettgerii ATCC 9918 colonias incontables hasta la dilución de 10<sup>-8</sup>.

Aspergillus niger EM-2 y EM-3 desarrolló confluyente hasta la dilución de 10<sup>-8</sup>. en ambos casos.

Ashbya gossypii desarrolló confluyente hasta la dilución de 10<sup>-4</sup> antes y desarrolló confluyente hasta la dilución de 10<sup>-3</sup> después de la liofilización.

El sellado y el vacío de las ampollitas fueron satisfactorios en todos los casos.

## 5. DISCUSION

### Acidos orgánicos :

Después de obtener los rendimientos de las ocho cepas de Aspergillus niger probadas, se encontró que las mejores productoras de ácido cítrico fueron la EM-2 y la EM-3 con rendimientos de 39.88 % y 45.35 % respectivamente; el rendimiento reportado en la literatura es de 42.35 %, en las mismas condiciones de cultivo que las empleadas en este trabajo. Estas cepas se liofilizaron para su conservación por considerarlas buenas productoras de este ácido.

Con el Acetobacter suboxydans el rendimiento fué de 85.20 % de ácido acético; la literatura reporta un rendimiento de 89 % en las mismas condiciones de cultivo que las descritas para la producción de este ácido. Esta cepa se conservo por el método de liofilización.

El Lactobacillus delbreuckii probado produjo un rendimiento del 69.96 % de ácido láctico; la literatura consultada reporta un rendimiento del 97 % en las mismas condiciones de cultivo; por lo que el L. delbreuckii disponible en el Cepario de la Facultad de Química realmente no es muy buen productor de ácido láctico aunque produce una cantidad aceptable. Esta cepa también se liofilizó para su conservación.

### Enzimas :

De las dos cepas probadas de Bacillus subtilis productoras de  $\alpha$ -amilasa la cepa ATCC 6633 fué la mejor productora con una actividad específica de 38.76 U / mg que es muy cercana a la reportada en la literatura ( 39 U / mg) en las mismas condiciones de cultivo. Esta cepa se conservo mediante liofilización.

Después de probar los cepas de Bacillus subtilis productoras de proteasa se encontró que dos cepas la ATCC 6051 y la C<sub>1</sub> son buenas productoras de esta enzima. La cepa ATCC 6051 produce una actividad proteolítica de 43 U y la cepa C<sub>1</sub> una actividad proteolítica de 47 U igual a la reportada por la literatura en las mismas condiciones de cultivo. Estas dos cepas se liofilizaron para su conservación.

La actividad específica de la triptofanasa de Proteus rettgerii ATCC 9918 fué de 7.1 expresado en  $\mu\text{g}$  de indol / D.O.<sub>540</sub> que es muy cercana a la reportada en la literatura (7.24  $\mu\text{g}$  de indol / D.O.<sub>540</sub>). Esta cepa se liofilizó para su conservación.

#### Vitaminas y Aminoácidos :

La cepa de Ashbya gossypii disponible en el Cepario de la Facultad de Química es una buena productora de riboflavina ya que produjo 0.74 mg / ml y la literatura reporta una producción de 1 mg / ml de esta vitamina en las mismas condiciones de cultivo. Esta cepa se conservó por el método de liofilización.

La literatura reporta una producción de 0.38  $\mu\text{g}$  / ml de cianocobalamina por Streptomyces olivaceus; la cepa disponible en el Cepario de la Facultad de Química produjo 0.34  $\mu\text{g}$  / ml en las mismas condiciones de cultivo que las reportadas por la literatura. Esta cepa se conservó por el método de liofilización por considerarse una buena productora de ésta vitamina.

La cepa disponible en el Cepario de la Facultad de Química de Corynebacterium glutamicum produjo 27.5 mg/ml de ácido glutámico; esta cantidad de aminoácido se considera buena ya que la literatura reporta 30 mg / ml como una buena producción de ácido glutámico por el C. glutamicum. Esta cepa se liofilizó para su conservación .

### Antibióticos :

Una vez obtenidos los rendimientos de las cuatro cepas probadas de Penicillium s.p productoras de penicilina, se encontro que las mejores productoras de este antibiótico son las cepas C<sub>3</sub> que produce 300 mg /ml y la C<sub>8</sub> que produce 320 mg / ml; la literatura reporta un rango de producción entre 250 mg / ml y 500 mg / ml dependiendo de la cepa y las condiciones de cultivo. Estas cepas se liofilizaron para su conservación.

El Bacillus polymyxa produjo 55 µg / ml de polimixina; esta producción es cercana a la reportada por la literatura que es de 60 µg / ml a las mismas condiciones de cultivo. Esta cepa se liofilizó para su conservación.

La cepa disponible en el Cepario de la Facultad de Química de Streptomyces griseus es una buena productora de estreptomycinina ya que produjo 0.265 mg/ml de este antibiótico mientras la literatura consultada reporta 0.25 mg/ml en las mismas condiciones de cultivo. Esta cepa se conservó por el método de liofilización.

### Etenol :

De las cepas de Saccharomyces cerevisiae productoras de etanol que se probaron, la cepa C<sub>1</sub> y la cepa C<sub>5</sub> son las mejores productoras : La C<sub>1</sub> da un rendimiento de 11.36 % y la C<sub>5</sub> un rendimiento de 10.03 %. La literatura reporta rendimientos entre el 10 y el 15 % dependiendo de la cepa y las condiciones de cultivo . Estas dos cepas se liofilizaron para su conservación por considerarlas buenas productoras de etanol.

Con lo anterior podemos decir que los métodos de valoración empleados en el presente trabajo demostraron que los microorganismos productores de sustancias de interés industrial que integran esta subcolección y las técnicas

empleados para su producción (medios y condiciones de cultivo) son las adecuadas en la forma en que están descritas.

Comparando los resultados de las valoraciones de las sustancias producidas por los microorganismos que integran esta subcolección, con los reportados en los diferentes artículos revisados, se encontró que, en las cantidades de las sustancias producidas por esta subcolección no había diferencias significativas con las reportadas bajo las mismas condiciones de trabajo.

## 6. CONCLUSIONES

- 6.1 El uso de microorganismos a nivel industrial para la producción de sustancias como Ácidos orgánicos, Enzimas, Vitaminas y Aminoácidos, antibióticos y Etanol, por su bajo costo, fácil recuperación y pureza de las sustancias obtenidas es importante para la autosuficiencia del país respecto a dichas sustancias.
- 6.2 Esta subcolección integrada por 13 cepas productoras de diferentes sustancias, incluyendo el montaje de los métodos para la producción óptima y valoración sencilla de trece sustancias de interés industrial, constituyen un importante recurso biológico y didáctico para la Facultad de Química y para otras instituciones que puedan requerirlo.
- 6.3 Por ésto la presente subcolección será de gran utilidad para las materias de Microbiología Industrial, Seminario de Microbiología Industrial, Biosíntesis Microbiana de Aplicación Industrial, Enología, Tecnología de Alimentos y Fisiología y Bioquímica de Microorganismos.
- 6.4 La aplicación de los métodos para la cuantificación de las sustancias de interés industrial producidas por fermentación, demostró que los microorganismos productores que integran esta subcolección y las técnicas para la producción de dichas sustancias son confiables y aplicables en la forma en que están descritos ya que tienen rendimientos parecidos a los reportados en condiciones óptimas por la literatura consultada.
- 6.5 Estas cepas pueden utilizarse dentro de la Facultad para la realización de prácticas sencillas e ilustrativas sobre la producción de sustancias de gran interés industrial a bajo costo por microorganismos.

7.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alexopoulos, C.J.  
"Introductory Mycology"  
John Wiley and Sons  
New York (1979).
- 2.- Allgerer J.R. (1960)  
Adv. Appl. Microbiol. 2 163-182.
- 3.- Anthony H. Rose  
"Industrial Microbiology"  
Butterworths London (1961)
- 4.- Antibiotics Biosynthesis I and II  
Edited by Gottlieb, D. and Shaw, D.P.  
Springer Verlag  
New York (1976)
- 5.- B.B.L.  
"Manual de Procedimientos en Laboratorios y de Productos"  
Becton, Dickinson de México.  
México (1971)
- 6.- Bergey's  
"Manual of Determinative Bacteriology"  
Octava edición  
Baltimore M.D. U.S.A. (1974)
- 7.- Bull. Natl. Bur. Std. (1913) 9 3

- 8.- Burdon  
"Microbiologia"  
Publicaciones Culturales, S.A.  
México (1982).
- 9.- Casida L.E.  
"Industrial Microbiology"  
John Wiley and Sons. Inc.  
U.S.A. (1986)
- 10.- Cohee R.F. (1959)  
Food Eng. 31 (3) 58-59.
- 11.- DIFCO  
"Media for Microbiological Assay of Vitamins and Aminoacids"  
U.S.A. (1971)
- 12.- Edwards, R.M. (1984)  
J. Gen Microbiol. 130 1535-1542.
- 13.- "Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos"  
México (1974)
- 14.- Farmacos 1973  
Editorial Alhambra  
México (1973)
- 15.- Guzkova E.P. and Leginova .E.P. (1966)  
Mikrobiologiya 35 423

- 16.- Hanster and Ward.  
Induser Engeng Chem (1954) 46 238
- 17.- Huitron E. d C.  
"Biotecnología de Enzimas"  
U.N.A.M. (1983).
- 18.- Kuranova I.F. et. al. (1966)  
Mikrobiologiya 35 435
- 19.- Krasilinikova E.N. (1965)  
Mikrobiologiya 34 239
- 20.- Kinoshita et.al. (1959) Advanc. Appl. Microbiol. 5 201
- 21.- "La Biología Contemporánea"  
"Las Ciencias del Siglo XX"  
U.N.A.M. (1984).
- 22.- Lehninger L.  
"Biochemistry"  
New York (1979).
- 23.- Le Page G.A. (1946)  
J. Biol. Chem 162 163
- 24.- Moyer A.J. (1953)  
Appl. Microbiol. 1 7
- 25.- New Horizons in Industrial Microbiology  
London The Royal Society  
London (1980).

- 26.- Niwa K. et. al. (1971)  
Ger. Offen 2 48
- 27.- Prescott and Dunn's  
"Industrial Microbiology"  
AVI Publishing Company, Inc.  
U.S.A. (1983).
- 28.- Quintero R.R.  
"Ingenierfa Bioquimica"  
Alhambra Mexicana  
México (1981)
- 29.- Stryer L.  
"Bioquimica"  
Reverté Benezolana  
Venezuela (1976)
- 30.- Ulloa M.  
"Atlas de Micologia Básica"  
Argentina (1978)
- 31.- Waksman M. (1963)  
Biochim Biophys. ACTA 158 3
- 32.- Wolinsky E. (1972)  
Mikrobiologiya 9 277
- 33.- Yang H.Y. (1973)  
Am. J. Enol. 24 1