CUESTIONARIO I

LABORATORIO DE BIOSÍNTESIS Y BIOTECNOLOGÍA - SEMESTRE 2024-I

1. ¿Qué características tiene una fermentación sumergida?
   De acuerdo con Cruz Rosales (2021, pág. 20):
   "La fermentación sumergida[:]
   1. involucra aquellos procesos que se realizan con los agentes biológicos inmersos en la fase acuosa [...]
   2. Es un sistema homogéneo donde los nutrientes y los organismos vivos [están] uniformemente distribuidos debido a la constante agitación [...]
   3. [es fácil] controlar parámetros como temperatura, aireación y pH, lo que procura el mantenimiento más estable del medio de crecimiento [...]
   4. repetitiva, reproducible y fácil de monitorear [...]
   5. [se forman] pellets, lo que facilita la separación del micelio finalizada la fermentación".

2. ¿Cuáles son las características y usos del ácido cítrico?
   De acuerdo con Muñoz-Villa et al (2014, pág. 18-20):
   "El ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3- propanotricarboxílico), es uno ácido orgánico que puede ser considerado natural, sin embargo también puede ser sintetizado vía laboratorio, es un ácido orgánico que se encuentra en casi todos los tejidos animales y vegetales. Físicamente es un polvo cristalino blanco que puede presentarse de manera anhidra o como monohidrato, considerado un tri-ácido carboxílico, su estructura química se presenta en la Figura 1.

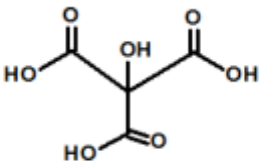


Figura 1. Estructura química del ácido cítrico.

   Para su producción a gran escala se utiliza la fermentación del hongo *Aspergillus nige*r entre otros métodos de obtención. Por su sabor agradable, baja toxicidad y otras propiedades fisicoquímicas, el ácido cítrico es uno de los principales aditivos alimentarios, usado como conservador, antioxidante, acidulante y saborizante de alimentos, además es ampliamente usado en medicamentos".

3. ¿Cuál es el fundamento de la técnica de ácido-3,5-dinitrosalicílico para cuantificar carbohidratos reductores y la sensibilidad del método?
   El ácido-3,5-dinitrosalicílico reacciona con los azúcares reductores (p. ej. glucosa) para formar el ácido 3-amino-5-dinitrosalicílico, un compuesto de color ámbar cuyo máximo de absorbancia está a 540 nm. A cantidades conocidas, se realiza una curva de calibración para interpolar la concentración de una muestra problema.

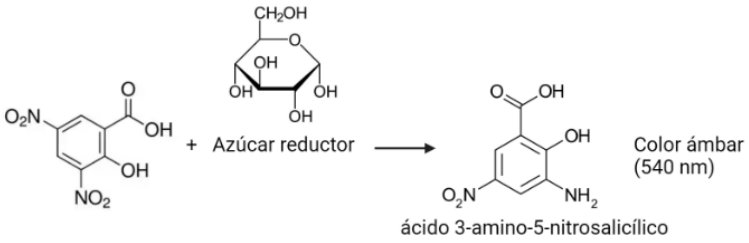


Figura 2. Reacción del ácido-3,5-dinitrosalicílico con azúcar reductor.

Francisco de la Peña

4. ¿En qué consiste el fundamento del conteo de esporas con la cámara de Neubauer? Incluir el diagrama del procedimiento

   De acuerdo con el Laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos II (fecha desconocida):

   "La cámara de recuento, **Neubauer**, es un dispositivo de precisión hecho de vidrio óptico especial. Se utiliza para contar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio. [...] también llamada, **Hematocimetro** es un grueso portaobjetos de cristal, dividido en tres secciones, la sección media a su vez cuenta con un rayado fino formando una cuadrícula de **3 mm x 3 mm** identificable fácilmente al microscopio".

   En los cinco cuadrantes señalados en la Figura 3, se cuentan las esporas que se ubican en cada uno de los cuadrantes y se realiza un promedio.

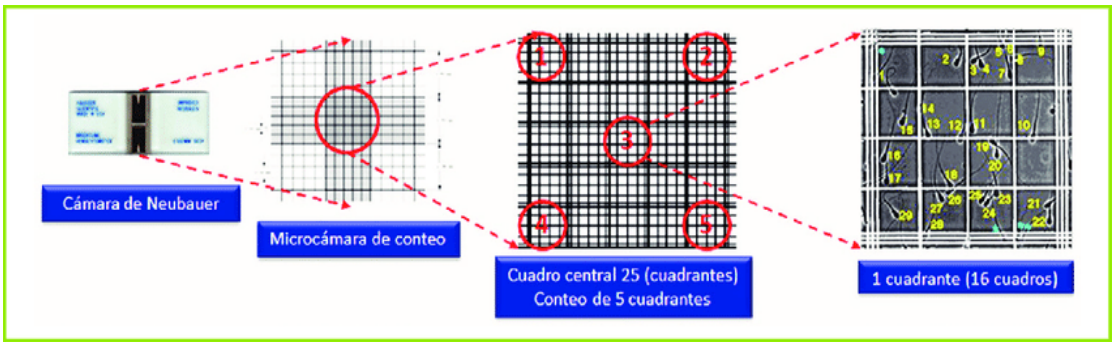


   Figura 3. Esquema del conteo de esporas con la cámara de Neubauer, imagen tomada de Olivera-Angel et al (2014).

5. ¿Qué microorganismos se utilizan en la industria para producir ácido cítrico? Mencionar géneros y especies

   De acuerdo con López Ríos et al (2006, pág. 40): "Entre los microorganismos capaces de producir y acumular ácido cítrico se encuentran las especies de los géneros *Aspergillus, Citromyces, Penicillium, Monilia, Candida* y *Pichia.* Las especies de *Aspergillus* negros y especialmente *Aspergillus niger*, son las más empleadas en este tipo de producción; las más efectivas son las que presentan baja actividad de las enzimas isocitrato deshidrogenasa y aconitasa hidratasa y una alta actividad de la citrato sintetasa".

6. Investiga el significado del acrónimo GRAS (Generally Recognized as Safe) "

   De acuerdo con el Ministerio de Comercio Exterior y Turismo de Perú (2018 , pág. 9): "GRAS es un acrónimo de la frase Generalmente Reconocido Como Seguro . Según las secciones 201(s) y 409 de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (la Ley), cualquier sustancia que se agregue intencionalmente a los alimentos es un aditivo alimentario, que está sujeto a revisión y aprobación previa a la comercialización por parte de la FDA, a menos que la sustancia generalmente se reconoce, entre expertos cualificados, que se ha demostrado adecuadamente que es seguro en las condiciones de uso previsto, o a menos que el uso de la sustancia esté excluido de la definición de aditivo alimentario".

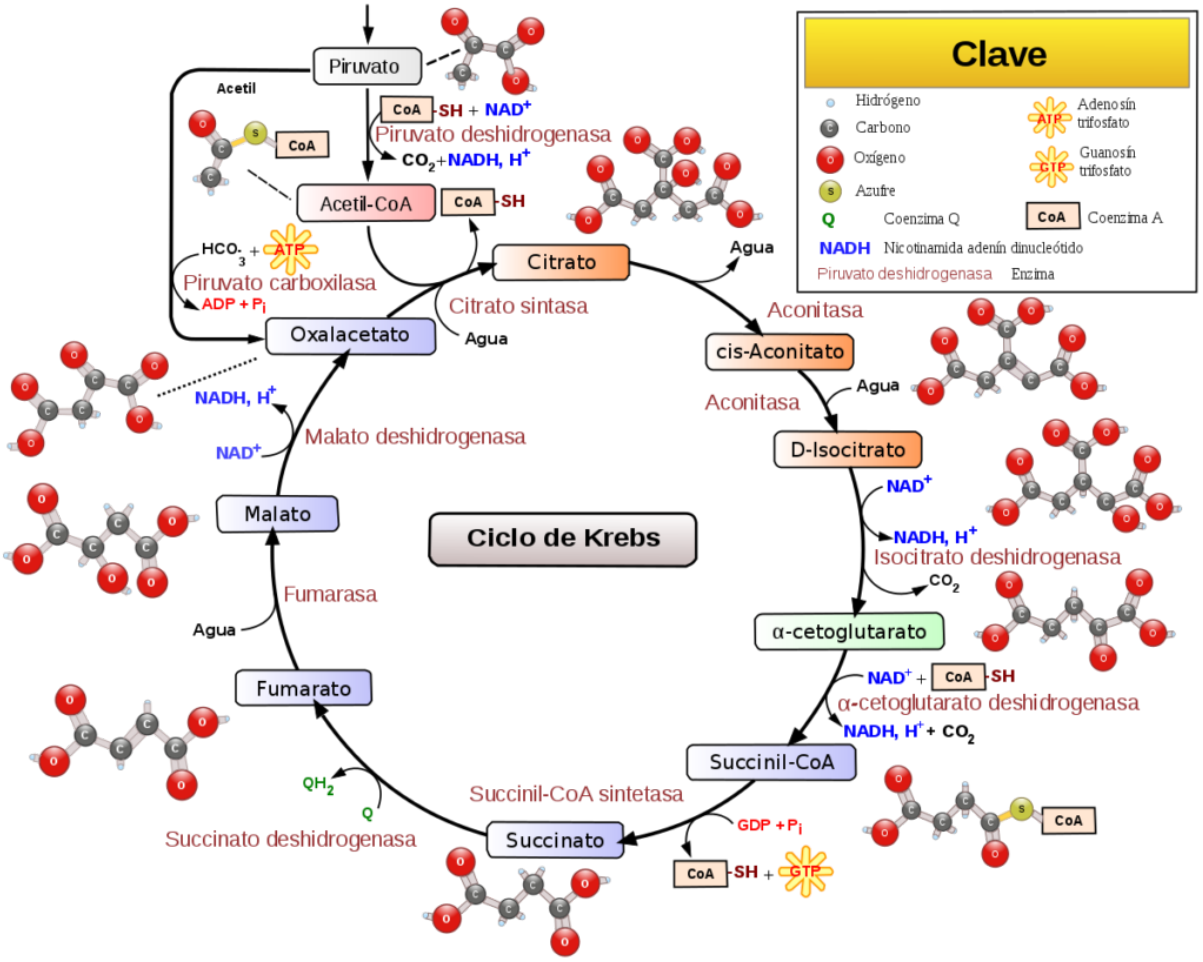
7. ¿Por qué *Aspergillus niger* es un microorganismo útil para producir ácido cítrico?
   De acuerdo con López Ríos et al (2006, pág. 40): “[porque] presenta baja actividad de las enzimas isocitrato deshidrogenasa y aconitato hidratasa y una alta actividad de la citrato sintetasa”.

8. ¿Cuantas y cuales son las etapas para la obtención de ácido cítrico por biosíntesis microbiana? incluir imagen de procedimiento
   De acuerdo con Garduño Torres y Maldonado Valenzuela (1984):
   - **Selección del microorganismo productor:** Se elige una cepa de microorganismo adecuada para la producción de ácido cítrico. El microorganismo más comúnmente utilizado es Aspergillus niger, una especie de hongo filamentoso que es un productor natural de ácido cítrico.
   - **Preparación del medio de cultivo:** Se prepara un medio de cultivo adecuado que contenga nutrientes esenciales para el crecimiento y la producción del microorganismo. El medio debe proporcionar una fuente de carbono y otros nutrientes necesarios para el metabolismo microbiano.
   - **Inoculación:** El microorganismo seleccionado se introduce en el medio de cultivo en una etapa temprana. Esto se realiza mediante la transferencia de esporas o células de cultivos previos al nuevo medio.
   - **Fermentación:** El cultivo se lleva a cabo en un fermentador, donde se controlan las condiciones de temperatura, pH, agitación y suministro de oxígeno. Estas condiciones óptimas permiten que el microorganismo crezca y produzca ácido cítrico de manera eficiente.
   - **Monitoreo y ajuste:** Durante la fermentación, se monitorean constantemente los parámetros del cultivo, como la concentración de biomasa, el consumo de nutrientes y la producción de ácido cítrico. Si es necesario, se realizan ajustes en las condiciones para optimizar la producción.
   - **Extracción y purificación:** Una vez que la producción de ácido cítrico ha alcanzado niveles significativos, se procede a la extracción del ácido cítrico del medio de cultivo. Esto puede implicar filtración, separación de biomasa y procesos de purificación química para obtener el producto en forma más concentrada y pura.
   - **Recuperación del producto:** El ácido cítrico recuperado se purifica y cristaliza para obtener la forma deseada del compuesto. Esto puede involucrar procesos de precipitación y filtración.
   - **Secado y envasado:** Los cristales de ácido cítrico obtenidos se secan para eliminar la humedad y luego se envasan en condiciones adecuadas para su almacenamiento y distribución.
   - **Tratamiento de residuos:** Se gestionan de manera adecuada los subproductos y los residuos generados durante el proceso de producción para minimizar el impacto ambiental.

   Es importante señalar que las etapas exactas pueden variar según el microorganismo utilizado, el proceso de producción y las tecnologías específicas involucradas en la biosíntesis de ácido cítrico.

9. ¿Qué sucede metabólicamente en el ciclo de krebs cuando *Aspergillus niger* se encuentra con una condición de estrés por falta de hierro?

Como podemos observar en la Figura 4, la la aconitasa es una enzima principal en el ciclo de Krebs que posee una función secundaria.



De acuerdo con Mansilla Marchetti (2017): “Esta enzima es importante porque se ha demostrado que es un regulador de la expresión genética, con una dimerización dependiente de hierro. En las levaduras es importante para el mantenimiento y asociación del ADN mitocondrial mediante la formación de nucleoides”.
Por tanto, la deficiencia de hierro provocaría una ralentización en el metabolismo de Aspergillus niger, y la activación de mecanismos metabólicos secundarios.

10. Elabora un cuadro comparativo con las diferencias entre los metabolitos primarios y los metabolitos secundarios.

Metabolitos primarios	Metabolitos secundarios
Se consideran esenciales para los microorganismos para un crecimiento adecuado. Se le conoce como un metabolito central.	No juegan un papel en el crecimiento, desarrollo y reproducción, y se forman durante el final o cerca de la fase estacionaria del crecimiento.
Se forman durante la fase de crecimiento como resultado del metabolismo energético, y se consideran esenciales para un	Normalmente se forman durante el final o cerca de la fase estacionaria del crecimiento

crecimiento adecuado	
Ejemplos de metabolitos primarios incluyen alcoholes tales como etanol, ácido láctico y ciertos aminoácidos	Compuestos orgánicos producidos a través de la modificación de metabolitos sintasas primarias.
Otro ejemplo de metabolito primario comúnmente utilizado en microbiología industrial incluye el ácido cítrico. El ácido cítrico, producido por *Aspergillus niger*, es uno de los ingredientes más utilizados en la producción de alimentos. También se usa comúnmente en las industrias farmacéutica y cosmética.	Ejemplos de metabolitos secundarios con importancia en microbiología industrial incluyen atropina y antibióticos como eritromicina y bacitracina.

Cuadro comparativo elaborado a partir de Boundless (2017) *Microbiology*.

BIBLIOGRAFÍA:

- Boundless (2017) Microbiology. Recuperado de: https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Libro%3A_Microbiolog%C3%ADa_(Sin_l%C3%ADmites)/17%3A_Microbiolog%C3%ADa_Industrial/17.1%3A_Microbiolog%C3%ADa_Industrial/17.1C%3A_Metabolitos_Primarios_y_Secundarios
- Cruz Rosales, J. E. (2021) *Análisis comparativo de hidrolasas producidas por* Aspergillus flavus *en fermentación sumergida y cuando invade semillas de maíz mexicano nativas e irradiadas.* Facultad de Química. UNAM. Recuperado de: http://132.248.9.195/ptd2021/agosto/0814500/Index.html
- Garduño Torres, L y Maldonado Valenzuela, A. (1984). Biosíntesis microbiana del ácido láctico a partir de papa. Facultad de Química. UNAM. Recuperado de: http://132.248.9.195/pmig2019/0018394/Index.html
- Laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos II (fecha desconocida). Anexo 2: Cámara de Neubauer. FES Zaragoza. Recuperado de: https://blogceta.zaragoza.unam.mx/manualbct2/anexo-2-camara-de-neubauer/
- López Ríos, C. A. et al (2006). PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO CON Aspergillus niger NRRL 2270 A PARTIR DE SUERO DE LECHE. Dyna, Año 73, Nro. 150, pp. 39-57. Medellín, Noviembre de 2006. ISSN 0012-7353. Recuperado de: http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v73n150/a04v73n150.pdf
- Mansilla Marchetti, S. (2017) Caracterización bioquímica de una aconitasa mitocondrial de mamífero. CEIBIO, Uruguay. Recuperado de: https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10127/1/uy24-18404.pdf
- Ministerio de Comercio Exterior y Turismo (2018). Guía para el reconocimiento de una sustancia GRAS en Estados Unidos. Recuperado de: https://repositorio.promperu.gob.pe/server/api/core/bitstreams/0857d7d4-2b90-49fa-8d59-d27f677b6013/content
- Muñoz-Villa, A. (2014) Ácido Cítrico: Compuesto Interesante. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. AQM. Recuperado de: http://www.actaquimicamexicana.uadec.mx/articulos/12-4%20citricos.pdf

- Olivera Angel, M. (2014) Cultivo de tejidos reproductivos y producción y manipulación de embriones bovinos. Universidad de Antioquia. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/281864896_Cultivo_de_tejidos_reproductivos_y_produccion_y_manipulacion_de_embriones_bovinos/link/55fc51a108ae07629e0b6edc/download
- Ramírez Velasco , L. (2009) Caracterización bioquímica de una clorogenato esterasa producida por fermentación en medio sólido sobre residuos del café. CIATEJ. Recuperado de: https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/444/1/Lorena%20Ram%C3%ADrez%20Velasco.pdf