

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
LICENCIATURA
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**UNIDAD DE ENSEÑANZA APRENDIZAJE
OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE INTERÉS INDUSTRIAL PARA LA
SALUD
(336020)**

Comisión de actualización de la carta descriptiva

Dr. Alejandro Azaola Espinosa

Dr. Juan Esteban Barranco Florido

Dra. María Angélica Gutiérrez Nava

Dr. Lino Mayorga Reyes

M. en C. Patricia Martínez Cruz

Dr. Hugo César Ramírez Saad

Fecha de conclusión de la actualización 15/12/2015

ÍNDICE

	Pág.
DATOS GENERALES	3
INTRODUCCIÓN	4
OBJETO DE TRANSFORMACIÓN	4
PROBLEMA EJE	5
OBJETIVO DEL UEA	5
ESTRUCTURA DEL UEA	5
LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	6
UBICACIÓN DEL UEA EN EL PLAN DE ESTUDIOS	6
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	7
PRIMERA UNIDAD	8
SEGUNDA UNIDAD	10
TERCERA UNIDAD	14
CUARTA UNIDAD	17
MODELOS EXPERIMENTALES	19
SESIONES EXPERIMENTALES	20
BIBLIOGRAFÍA	31
MODALIDADES DE EVALUACIÓN	33

DATOS GENERALES

Nombre del UEA:	OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE INTERÉS INDUSTRIAL PARA LA SALUD
Clave del UEA:	336020
Trimestre de impartición:	Trayectoria A, XI; Trayectoria B, IX y Trayectoria C, VIII
Créditos:	45
UEA precedente:	Prevención y control de la propagación microbiana
UEA subsiguiente:	Trayectoria A, Aseguramiento de la calidad en la industria químico farmacéutica, o Tecnologías moleculares para el diagnóstico y la terapéutica, o Tratamiento de residuos industriales, o Evaluación biofarmacéutica, o Análisis instrumental aplicado; Trayectoria B, Diseño y obtención de medicamentos de calidad y Trayectoria C, Los fármacos como modificadores de la funciones biológicas
No. Hrs./teoría/semana:	15
No. Hrs./prácticas/semana:	15
No. Hrs./ totales por trimestre:	330
No. Unidades	Cuatro
Fecha de elaboración:	Julio 2015
Comisión de rediseño del UEA	Dr. Alejandro A. Azaola Espinosa, Dr. Juan Esteban Barranco Florido, Dra. Rina María González Cervantes, Dra. Marisol López López y Dr. Lino Mayorga Reyes
Fecha de actualización de la carta descriptiva:	Noviembre 2015
Comisión de actualización de la carta descriptiva	Dr. Lino Mayorga Reyes, Dr. Alejandro Azaola Espinosa, Dr. Juan Esteban Barranco Florido, M. en C. Patricia Martínez Cruz, Dra. María Angélica Gutiérrez Nava, Dr. Hugo César Ramírez Saad.
Responsable de la actualización	M. en C. Patricia Martínez Cruz
Perfil idóneo del profesor de este UEA	Lic. Químico Farmacéutico Biólogo, Ingeniero Bioquímico Industrial, Ingeniero en Alimentos. Maestría en Biotecnología, Doctorado en Biotecnología

INTRODUCCIÓN

El UEA “Obtención de Metabolitos de Interés Industrial para la Salud” se ubica en el Tronco de Carrera de la licenciatura de QFB de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Corresponde a la segunda UEA del eje de biológicos y lo antecede “Prevención y Control de la Propagación Microbiana”. En este UEA el alumno relaciona los avances científicos y tecnológicos del campo de conocimiento de la Biología Molecular y Biotecnología, con la producción de metabolitos para la salud. Asimismo, dispone de una oportunidad valiosa para comprender y analizar textos con contenidos teóricos recientes de estos campos de la ciencia, que les serán útiles para fundamentar sus conocimientos y transformar su visión del mundo.

El Objetivo General de la UEA es que el alumno se capacite para seleccionar, identificar y desarrollar procesos biotecnológicos encaminados a la obtención de metabolitos microbianos de interés para la salud. Al finalizar esta UEA, el alumno será capaz de analizar y comprender procesos en los que intervengan microorganismos y aplicarlos en su práctica profesional dentro de la industria química farmacéutica y de alimentos, así como, en las áreas ambientales de otras industrias productivas. Además, le permitirá intervenir en la planeación de estrategias metodológicas donde la utilización de microorganismos sean indispensables para la producción de metabolitos, en el monitoreo y análisis de fermentaciones, así como en la degradación biológica de residuos industriales y urbanos que tienen un impacto directo en el medio ambiente, en el análisis de factores de riesgo del uso de microorganismos silvestres o nativos y de los microorganismos genéticamente modificados. Todo esto enmarcado bajo la legislación vigente y tomando en consideración los aspectos bioéticos necesarios para el manejo de seres vivos y su posible modificación genética. Finalmente, con todo lo anterior el alumno estará capacitado para integrarse en estudios de posgrado o en la enseñanza de nivel medio y medio superior.

OBJETO DE TRANSFORMACIÓN:

El Objeto de Transformación de esta UEA es la obtención de metabolitos de interés industrial para la salud. Este objeto de transformación permite al estudiante adentrarse en la comprensión de un conjunto de procesos biológicos relacionados con la manipulación de los microorganismos, ya sea en sus condiciones fisicoquímicas o en su genoma, dentro del vastísimo campo de la Biotecnología. En términos generales, la Biotecnología se puede definir como el uso de organismos vivos o de compuestos obtenidos de ellos para obtener productos de valor para el hombre. La Biotecnología moderna está compuesta por una variedad de conocimientos y técnicas derivadas de la investigación en Microbiología, Bioquímica, Genética, Ingeniería Metabólica y Genética, Proteómica, Biología Celular y Molecular, así como Matemáticas, las cuales pueden ser utilizadas en cualquier industria que emplee células microbianas, vegetales o animales. La aplicación comercial de organismos vivos o sus productos, involucra la manipulación deliberada de sus genomas, de los procesos de regulación y síntesis de proteínas y de las vías metabólicas para la producción de compuestos de interés industrial y el mejoramiento de procesos industriales

Por tanto, se puede decir que la Biotecnología abarca desde los procesos biotecnológicos tradicionales, como por ejemplo la fermentación de alimentos, hasta la Biotecnología moderna, basada en la utilización de las nuevas técnicas del ADN recombinante (Ingeniería Genética), los anticuerpos monoclonales y los nuevos métodos de cultivo de células y tejidos.

En las últimas décadas, la Biología ha sufrido un cambio revolucionario, muchos de los problemas que en el pasado sólo podían estudiarse a nivel descriptivo, ahora se pueden analizar a nivel molecular, permitiendo caracterizar a los sistemas vivos en términos de sus componentes moleculares. El advenimiento de la tecnología de ADN recombinante ha resultado en un aumento exponencial correspondiente del conocimiento de los procesos celulares fundamentales. Por lo tanto, es muy importante que el QFB actual conozca y aplique estos conceptos de Biología Molecular en la resolución de los problemas biológicos que competen a su área profesional.

Por otra parte, esta UEA pretende que el alumno sea capaz de comprender la literatura científica, así como de diseñar experimentos y realizar investigaciones que utilicen técnicas de cultivo y fermentación de microorganismos para la producción de biomasa celular y de metabolitos derivados del metabolismo primario y

secundario; técnicas bioquímicas para determinar características fisiológicas de las células en estudio, de enzimas y técnicas de biología molecular para la tipificación de microorganismos, el estudio de vías metabólicas hasta el mejoramiento genético. Al final del UEA, el alumno comprenderá la potencialidad de manipular a los microorganismos con un enfoque dinámico, donde todos los procesos biológicos internos se encuentran presentes al mismo tiempo, solo que regulados. Asimismo, el alumno aprenderá a comunicar los resultados de su investigación de manera escrita y oral, utilizando las formas y el lenguaje apropiados.

PROBLEMA EJE

Obtención y caracterización de metabolitos por procesos de fermentación.

El diseño, análisis, modificación y control de los procesos bioquímicos y genéticos que realizan los microorganismos, son herramientas que cada día tienen más importancia en una sociedad donde la producción de metabolitos de interés para la salud humana y animal se basa en procesos altamente tecnificados.

La Biotecnología ha sido utilizada por el hombre desde los comienzos de la historia en actividades tales como la preparación del pan y de bebidas alcohólicas o el mejoramiento de cultivos y de animales domésticos. Aunque el concepto de Biotecnología es nuevo –esta denominación surge en los años sesentas del siglo XX, su primera expresión la encontramos hace 5000 años en los alimentos fermentados por hongos, producidos en China y en la elaboración de pan y cerveza en Egipto. Consideramos que esta primera etapa termina con los experimentos de Pasteur, quien junto con Joubert observó que en un cultivo de la bacteria del cólera, el crecimiento fue inhibido por una bacteria contaminante que llamaron bacilo común, probablemente *E. coli* y postularon por primera ocasión la posibilidad terapéutica de las bacterias. Este postulado se confirmó con el descubrimiento de la penicilina por Fleming en 1929.

La segunda etapa de la biotecnología se inicia con el establecimiento del “factor de transformación” por Avery y colaboradores en 1944, y finaliza con el descubrimiento de la doble cadena de ADN realizado por Watson y Crick en 1953. La tercera etapa de la biotecnología se inicia con la elaboración de la primera molécula de ADN recombinante por Cohen en 1973, dando origen a un crecimiento exponencial en esta área de conocimiento (cuyo mayor impacto ha sido en la industria farmacéutica), mostrando que el desarrollo de la ciencia básica y su aplicación tienen un potencial económico ilimitado.

Actualmente el impacto más evidente de la Biotecnología se observa en cuatro sectores: biomedicina, agricultura, química y ambiental, siendo la primera la que mayor crecimiento e influencia tiene en la sociedad. Así, en 1981 se aprueba y sale al mercado el primer producto comercial de diagnóstico con anticuerpos monoclonales. Al año siguiente se inició la comercialización de la primera molécula recombinante, la insulina humana. De 1982 a 1989, fueron aprobados por la Food & Drug Administration (FDA, USA), 18 fármacos basados en procesos biotecnológicos. En la última década del S. XX, se aprobaron 125 productos nuevos (promedio de 10 por año).

OBJETIVO DE LA UEA

Seleccionar, identificar y desarrollar procesos biotecnológicos para la obtención de metabolitos microbianos de interés para la salud. Para cumplir el objetivo del presente UEA se organizó en cuatro unidades.

ESTRUCTURA DE LA UEA: Las unidades y sus correspondientes objetivos son:

Unidad I. Historia de los procesos microbianos. Objetivo Reconocer la importancia de los procesos microbianos en el desarrollo histórico de la humanidad.

Unidad II. Metabolismo microbiano y su regulación. Objetivo Comprender el funcionamiento de las vías metabólicas y analizar los factores que modifican su funcionamiento para la obtención de metabolitos específicos.

Unidad III. Procesos de fermentación para la producción de metabolitos para la salud. Objetivo Comprender, analizar y reconocer la fermentación como proceso central para la obtención de metabolitos.

Unidad IV. Información genética de los microorganismos, su regulación y manipulación. Objetivo Comprender los mecanismos que regulan la expresión de la información genética y conocer los procesos que permiten su manipulación.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Para el desarrollo del proyecto de investigación del UEA se proponen las siguientes líneas de investigación, que ofrecen posibilidades de formación para el manejo de las técnicas implicadas en los procesos de producción de metabolitos de origen microbiano.

1. Producción de metabolitos por fermentaciones sumergidas o por fermentaciones en estado sólido
2. Caracterización y purificación de enzimas de interés para la salud o la industria química farmacéutica
3. Aislamiento y selección de cepas productoras de metabolitos de interés para la salud o la industria química farmacéutica
4. Empleo de técnicas moleculares para la manipulación de ADN en procariontes

Las competencias que se desarrollarán en el alumno serán:

Habilidades	Destrezas	Capacidades	Actitudes
Para realizar diseños experimentales Para proponer las técnicas analíticas para la determinación de parámetros establecidos Para integrar los conceptos teóricos con los resultados experimentales.	En la manipulación adecuada de microorganismos con las medidas de seguridad pertinentes En la utilización de técnicas analíticas, instrumentos y equipo del área de la microbiología	De análisis de los resultados obtenidos en los diseños experimentales De comprensión de los procesos bioquímicos de las células y su modificación para la producción de metabolitos Para comprender textos y artículos científicos referentes al campo de la biotecnología	Fomentar el trabajo colectivo Comprensión del impacto en el uso de organismos modificados en el medio ambiente

UBICACIÓN DEL UEA EN EL PLAN DE ESTUDIOS

El UEA Obtención de metabolitos de interés industrial para la salud (336020), se imparte de acuerdo con la Trayectoria A en el trimestre XI; para la Trayectoria B en el trimestre IX y para la Trayectoria C en el trimestre VIII de la Licenciatura de Química Farmacéutica Biológica. Le antecede el UEA Prevención y control de la propagación microbiana y le son posteriores en la Trayectoria A, los UEAs Aseguramiento de la calidad en la industria químico farmacéutica, o Tecnologías moleculares para el diagnóstico y la terapéutica, o Tratamiento de residuos industriales, o Evaluación biofarmacéutica, o Análisis instrumental aplicado; respecto a la Trayectoria B es posterior el UEA Diseño y obtención de medicamentos de calidad y en la Trayectoria C es posterior el UEA Los fármacos como modificadores de la funciones biológicas

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sesiones Teóricas	Unidad I	Unidad II				Unidad III			Unidad IV			Evaluación Global
Modelos experimentales			Modelo 1-2		Modelo 3-4							
Investigación	Selección del tema	Elaboración del protocolo	Elaboración del marco teórico y desarrollo experimental				Análisis de resultados		Elaboración del informe final	Entrega y presentación del informe	Evaluación de la investigación	
Evaluaciones		X			X			X			X	X

UNIDAD I HISTORIA DE LOS PROCESOS MICROBIANOS

OBJETIVO GENERAL DE LA UNIDAD. Que el alumno Reconozca la importancia de los procesos microbianos en el desarrollo histórico de la humanidad.

Contenidos	Objetivos de proceso	Actividades	Duración en sesiones	Bibliografía
1.1. Discusión y análisis del UEA en el programa de estudios y en el perfil profesional.	Que el alumno comprenda los contenidos del UEA y su objeto de transformación en el currículo de sus estudios, así como en el marco de su práctica profesional	Los alumnos y el profesor discutirán y analizarán los contenidos del UEA El profesor analizará con los alumnos cuáles son las fuentes de información más adecuadas para estudiar los contenidos del UEA Actividad extra sugerida: programar en la hemeroteca, un curso de búsqueda bibliográfica (SciFinder) y del uso de EndNote	1	UEA
1.2. Importancia de los procesos de fermentación y biotransformación en la salud.	Que el alumno comprenda que los procesos celulares pueden ser reproducidos y/o rediseñados <i>in vitro</i> a nivel laboratorio e industrial para la producción de sustancias de interés para la salud.	En el aula, a manera de seminario, los alumnos discutirán y presentarán algunos artículos científicos que tengan como objetivo principal la producción de metabolitos de interés para la salud	1	36 Revistas científicas en línea de la UAM. http://www.bidi.uam.mx
1.3. Ubicación histórica de la Biotecnología. 1.3.1. Biotecnología de 1ra. generación: fermentaciones. 1.3.2. Biotecnología de 2da generación: ingeniería genética. 1.3.3. Biotecnología de 3ra generación: genómica, proteómica y metabolómica.	Que el alumno analice como los microorganismos en la evolución de las civilizaciones has sido importantes desde el punto de vista empírico hasta el científico para innovar y mejorar los procesos para la producción y conservación de los alimentos, la producción de antibióticos, aminoácidos y vitaminas hasta la producción de proteínas recombinantes de interés para la salud	Que los alumnos discutan y analicen como algunas civilizaciones encontraron y posteriormente desarrollaron procesos y mejoras para la producción y conservación de los alimentos donde los microorganismos, ahora analizados con los nuevos avances científicos explican el papel que han tenido y tienen para la conservación de la salud	2	4, 6, 7, 9, 10, 30, 11

Contenidos	Objetivos de proceso	Actividades	Duración en sesiones	Bibliografía
1.3.4. Aspectos bioéticos en la biotecnología actual	Que el alumno conozca los programas de seguridad biológica en el laboratorio así como los aspectos éticos de estudios sobre el uso actual de los microorganismos cuando se usan como probióticos	Discutir en el aula los códigos de prácticas para la manipulación sin riesgo de material biológico potencialmente infeccioso: evaluación del riesgo microbiológico y niveles de bioseguridad 1, 2, 3 y 4	1	Revistas científicas en línea de la UAM. http://www.bidi.uam.mx
Número de sesiones			5	

UNIDAD II. METABOLISMO MICROBIANO Y SU REGULACIÓN

OBJETIVO GENERAL DE LA UNIDAD. Que el alumno comprenda el funcionamiento de las vías metabólicas y analice los factores que modifican su funcionamiento para la obtención de metabolitos específicos

Contenidos	Objetivos de proceso	Actividades	Duración en sesiones	Bibliografía
<p>2.1. Principales productos metabólicos obtenidos por fermentación: biomasa, ácidos orgánicos, etanol y biocombustibles, aminoácidos, enzimas, polisacáridos, colorantes, vitaminas y antibióticos.</p>	<p>Que el alumno identifique el potencial que ofrecen los microorganismos para la producción de metabolitos de interés a través del estudio de la microbiota que existe en la naturaleza</p>	<p>Presentación a través de seminarios de los principales productos obtenidos por fermentaciones microbianas. Discusión del tema en coordinación con el docente.</p> <p>Actividad extra sugerida: revisión y discusión de dos artículos: “Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals” y “New challenges and opportunities for industrial biotechnology”</p>	3	34, 36, 37
<p>2.2. Enzimas.</p> <p>2.2.1. Estructura y función de las enzimas.</p> <p>2.2.2. Efecto de pH y temperatura en la estructura y actividad enzimática.</p> <p>2.2.3. Concepto de dominio catalítico y dominio estructural. Ejemplo enzimas Glicosil hidrolasas: celulasas.</p> <p>2.2.4. Enzimas como catalizadores biológicos.</p> <p>2.2.5. Concepto de energía libre ΔG y ΔG° (K_{eq}).</p>	<p>Que el alumno comprenda la función de las enzimas en las vías metabólicas</p> <p>Que el alumno sea capaz de medir y analizar la actividad de las enzimas</p>	<p>Seminarios del Tema por equipo de alumnos y discusión en clase en coordinación con el docente.</p> <p>Resolución de un cuestionario sobre el tema por equipos y discusión de las respuestas junto con el docente.</p> <p>Resolución de ejercicios en el aula, para cálculo de parámetros cinéticos (V_{max}, K_m y K_i). Tarea de cinética enzimática y revisión de ejercicios en el aula</p> <p>Actividad extra sugerida: revisión y discusión de artículos relacionados con</p>	<p>2</p> <p>1</p> <p>1</p> <p>1</p>	1, 3, 17, 26, 42

<p>2.2.6. Disminución de la ΔG^\ddagger de activación.</p> <p>2.2.7. Cinética enzimática; modelo de Michaelis y Menten.</p> <p>2.2.8. Desarrollo de las ecuaciones de Michaelis y Menten y Lineweaver y Burke.</p> <p>2.2.9. Concepto K_{cat}/K_m como criterio de las reacciones enzimáticas.</p> <p>2.2.10. Modelos de Inhibición enzimática, Concepto y cálculo de K_i.</p>		la caracterización de enzimas		
<p>2.3. Metabolismo.</p> <p>2.3.1. Regulación y coordinación del metabolismo primario y secundario.</p> <p>2.3.2. Regulación fisiológica.</p> <p>2.3.3. Represión catabólica.</p> <p>2.3.4. Retroalimentación por producto final.</p> <p>2.3.5. Enzimas alostéricas</p>	<p>Que el alumno adquiera y aplique el conocimiento de las rutas metabólicas para la producción de metabolitos</p> <p>Que el alumno entienda los mecanismos de regulación de las enzimas que participan en una vía metabólica o catabólica a nivel bioquímico y las diferencias de regulación entre vías primarias y secundarias</p> <p>Que el alumno retome los conocimientos de las principales vías metabólicas, profundizando en el estudio de las reacciones enzimáticas que se presentan en cada paso de las vías y que determinan la producción de energía, y a su vez la velocidad de crecimiento en la célula.</p> <p>Que el alumno adquiera un enfoque</p>	<p>Análisis de las vías primarias principales (Embden-Meyerhoff-Parnas, Entner-Doudoroff, Pentosa Fosfato, Ciclo de Krebs, Glioxilato) en <i>Escherichia coli</i>.</p> <p>Identificación de las enzimas de control en cada una de las vías anteriores así como las conexiones con otras vías. Así mismo se analizarán los genes que codifican para cada una de estas enzimas y la información sobre su regulación, tanto a nivel actividad como a nivel genético.</p> <p>Se resolverá un cuestionario sobre el tema por equipos y se discutirán las respuestas coordinados por el docente</p>	<p>2</p> <p>2</p> <p>1</p>	<p>2, 25, 26, 32, 43</p>

	de estudio del metabolismo celular de una forma integrada al contrario del enfoque que estudia las reacciones de forma individual y así poder estudiar las interacciones de las reacciones bioquímicas que participan en una red metabólica.	Actividades sugeridas extractase: discusión y análisis del artículo: Systems biotechnology: an emerging trend in metabolic engineering of industrial microorganisms	1	
2.4. Transporte de nutrientes a las células procariontes. 2.4.1 Difusión simple. 2.4.2 Transporte facilitado o mediado. 2.4.3. Transporte activo. Simporte y antiporte dependientes de la ATPasa. 2.4.4 Transporte activo Translocación de grupos (sistema PTS).	Que el alumno conozca los diferentes mecanismos de ingreso de nutrientes a la célula y como el uso de alguno de estos va a determinar la preferencia del microorganismo por ciertos sustratos	Seminario del tema por equipo en clase y discusión coordinada por el docente. Búsqueda y discusión de un artículo que analice la importancia del transporte PTS para la producción de metabolitos Lectura sugerida: "Improvement of <i>Escherichia coli</i> production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system"	1	21,26,37
2.5. Análisis de vías metabólicas. 2.5.1. Función de las vías metabólicas. 2.5.2. Análisis de flujos metabólicos, Vías metabólicas centrales y conexión con vías primarias y secundarias. 2.5.3. Distribución del flujo de carbono en las vías metabólicas primarias. 2.5.4. Sitios de control: nodos de control rígidos y nodos de control flexibles. 2.5.5. Metabolismo primario. 2.5.5.1. Vías para la obtención de energía, ATP, NADH, NADPH. 2.5.5.2. Vías de biosíntesis para	Que el alumno aprenda a identificar las enzimas susceptibles de regulación en las vías en estudio y como esto va a determinar el flujo de carbono hacia la producción de metabolitos Que el alumno comprenda cómo se distribuye el flujo de las vías metabólicas que participan en los microorganismos para su crecimiento y producción de metabolitos Que el alumno se capacite para manipular la biosíntesis microbiana de metabolitos primarios y secundarios como productos finales de una fermentación	Exposición del tema por equipo en clase. Discusión con el docente. Actividad sugerida: Diagrama sobre la vía de síntesis de un aminoácido, indicando las enzimas involucradas en la vía y que son reguladas por acumulación del producto final. Actividad extraclase sugerida: Elaboración de las vías metabólicas para la síntesis de un metabolito primario y uno secundario utilizando el programa ChemBioOffice	2	2, 9,11, 25

<p>la producción de intermediarios metabólicos.</p> <p>2.5.5.3. Reacciones de polimerización. Construcción de proteínas.</p> <p>2.5.5.4. Reacciones de ensamblaje. Construcción de membrana celular.</p> <p>2.5.5.5. Potencial de las vías metabólicas para la producción de metabolitos para la salud. Estrategias para la producción de aminoácidos, ácidos orgánicos, enzimas, entre otras.</p>				
<p>2.6. Metabolismo secundario.</p> <p>2.6.1. Función del metabolismo secundario.</p> <p>2.6.2. Potencial de las vías metabólicas secundarias para la producción de metabolitos para la salud. Estrategias para la producción de antibióticos.</p>	<p>Que el alumno entienda la diferencia entre metabolismo primario y secundario y su importancia en la producción de metabolitos de interés industrial</p>	<p>Conexión con el metabolismo secundario, A partir de la vía metabólica realizada se llevará a cabo un análisis de la vía para la síntesis de un metabolito secundario, identificando a su precursor generado por una vía metabólica primaria.</p>	3	2, 25, 36, 37, 43
Total de sesiones			20	

UNIDAD III. Procesos de fermentación para la producción de metabolitos para la salud

OBJETIVO GENERAL DE LA UNIDAD. Que el alumno comprenda analice y reconozca la fermentación como proceso central para la obtención de metabolitos.

Contenidos	Objetivos de proceso	Actividades	Duración en sesiones	Bibliografía
<p>3.1. Modelos de crecimiento microbiano.</p> <p>3.1.1. Métodos directos y métodos indirectos para la determinación de biomasa.</p> <p>3.1.2. Modelos matemáticos del crecimiento microbiano.</p> <p>3.1.3. Tasas de crecimiento, tiempo de duplicación, tiempo de generación.</p>	<p>Que el alumno comprenda las diferentes formas de crecimiento de bacterias, levaduras y hongos durante los procesos fermentativos para la generación de metabolitos.</p> <p>Que el alumno estudie las diferentes formas de medir el crecimiento microbiano (métodos directos e indirectos) , durante los procesos de fermentación.</p>	<p>Trabajo en el aula:</p> <p>Discusión de lecturas y artículos científico-técnicos sobre las metodologías reportadas para medir el crecimiento celular en medios de cultivo sólidos, líquidos y con sustratos insolubles</p>	3	21, 23, 36, 37
<p>3.1.4. Parámetros cinéticos de las fermentaciones.</p> <p>3.1.4.1. Rendimientos.</p> <p>3.1.4.2. Tasa de producción y consumo: volumétrica y específica.</p> <p>3.1.4.3. Productividad.</p>	<p>Que el alumno comprenda el uso de modelos matemáticos para describir el crecimiento celular y su uso para controlar el ambiente químico y físico de los procesos de fermentación y su relación con el metabolismo microbiano</p>	<p>Realización de ejercicios para utilizar modelos matemáticos que describan el crecimiento microbiano (cálculo de μ, td, tg) y la cinética de fermentaciones (cálculo de Y, P_{max}, Qp, Qs, qp, qs)</p> <p>Trabajo de laboratorio:</p> <p>Observación al microscopio de los microorganismos utilizados en el proyecto de investigación</p> <p>Realización de una fermentación para la producción del metabolito propuesto en el protocolo de</p>	3	11, 36

		investigación. Medición del crecimiento microbiano, empleando la metodología propuesta en el protocolo de investigación		
3.2. Procesos de fermentación en lote. 3.2.1. Cultivos anaerobios. 3.2.2. Cultivos aerobios. 3.2.3. Cultivos líquidos en lote. Mantenimiento de las condiciones de agitación y aireación como limitantes de la transferencia de sustratos y oxígeno. 3.2.4. Transferencia de masa; concepto.	Que el alumno estudie la manera en que se cubren los requerimientos de oxígeno para la generación de biomasa a nivel matraz o en fermentador Que el alumno comprenda los procesos de transferencia de masa, utilizando como modelo de sustrato al oxígeno.	Trabajo en el aula: Investigación bibliográfica sobre los tipos de fermentaciones en lote en base a la atmosfera. Discusión de lecturas y artículos científico-técnicos para comprender como los parámetros cinéticos permiten relacionar el metabolismo celular con el consumo de sustratos y la formación de productos Revisión de literatura referente a los procesos de transferencia de masa en fermentaciones en lote Trabajo en laboratorio: Medición de la actividad enzimática y de la concentración de proteínas totales, empleando la metodología propuesta en el protocolo de investigación	1 1 1	10 , 19 , 36
3.3. Tipos de fermentaciones. Conceptos generales. 3.3.1. Procesos en lote. 3.3.2. Procesos en lote alimentado. 3.3.3. Procesos continuos.	Que el alumno comprenda la importancia y la diversidad de los procesos de fermentación para la producción industrial	Trabajo en el aula: Discusión en aula de lecturas y artículos científico-técnicos sobre los diversos procesos fermentativos para la producción industrial de metabolitos:	3	2, 10 , 36 , 37

		<p>conceptos, ventajas, desventajas y aplicaciones</p> <p>Trabajo en laboratorio: Modelo empleado durante el trabajo de investigación: fermentación en lote a nivel matraz</p>		
<p>3.4. Formulación de medios de cultivo.</p> <p>3.4.1. Relación carbono nitrógeno.</p> <p>3.4.2. Diseño de medios de cultivo con base en la composición celular y sus requerimientos.</p> <p>3.4.3. Conceptos generales del diseño experimental para la optimización de medios de cultivo.</p> <p>3.4.4. Diseños factoriales y fraccionados.</p>	<p>Que el alumno conozca los requerimientos nutricionales de los microorganismos así como algunos modelos matemáticos para diseñar los medios de cultivo</p> <p>Que el alumno aprenda a calcular los requerimientos de sustrato para la obtención de biomasa en un proceso fermentativo</p>	<p>Discusión en aula de literatura científico-técnica sobre requerimientos nutricionales de los microorganismos: macronutrientes, micronutrientes y factores de crecimiento</p> <p>Que los alumnos calculen los requerimientos de carbono, nitrógeno y oxígeno para la producción de biomasa. Análisis de resultados en el aula</p> <p>Trabajo en laboratorio: Que los alumnos, en equipos de investigación, calculen los rendimientos de biomasa por unidad de fuente de carbono utilizada y las velocidades volumétricas y específicas de biomasa y de producto a partir del consumo de la fuente de carbono de los datos generados durante el monitoreo de la fermentación</p>	<p>2</p> <p>1</p>	<p>10 , 21, 22, 37</p>
Número de sesiones			15	

UNIDAD IV. INFORMACIÓN GENÉTICA DE LOS MICROORGANISMOS, SU REGULACIÓN Y MANIPULACIÓN

OBJETIVO GENERAL DE LA UNIDAD. Que el alumno comprenda los mecanismos que regulan la expresión de la información genética y conozca los procesos que permiten su manipulación.

Contenidos	Objetivos de proceso	Actividades	Duración en sesiones	Bibliografía
4.1. Aspectos básicos de la genética microbiana. 4.1.1. Regulación de la expresión del gen. 4.1.2. Conceptos básicos de la regulación del gen a nivel transcripcional (activadores y represores). 4.1.3. Ejemplos de regulación negativa en bacterias (Operones Lac y Gal en <i>E. coli</i>). 4.1.4. Ejemplos de regulación positiva en bacterias (Operón arabinosa en <i>E. coli</i>). 4.1.5. Regulación de la expresión de genes por atenuación de la transcripción en <i>E. coli</i> .	Introducir al estudiante al campo de la Genética Molecular Microbiana. Que el alumno comprenda e integre los procesos de regulación que intervienen en el metabolismo celular. Que el alumno conozca las bases de la regulación genética en microorganismos procariontes.	Discusión de la importancia de la Genética molecular microbiana Análisis y discusión de textos y artículos científicos sobre los mecanismos de regulación de los operones de lactosa, galactosa y arabinosa en <i>E. coli</i>	1 3	2, 5, 14, 15, 16, 20, 24, 26, 27, 28.
4.2. Estrategias para el mejoramiento de cepas para la producción de metabolitos.	Que el alumno conozca los mecanismos para el mejoramiento de cepas por alteración genética.	En equipos de trabajo se analizarán y discutirán las estrategias que permiten mejorar la producción de metabolitos, utilizando como base el artículo "Improvement of microbial strains and fermentation processes"	1	14, 16
4.3. Concepto de mutación y tipos de mutación. 4.3.1. Diseño de estrategias experimentales (mutagénesis al azar) para el mejoramiento de	Que el alumno comprenda los fundamentos de la mutagénesis en el mejoramiento de microorganismos y sus efectos en la producción de metabolitos	En equipos de trabajo se elaborará una tarea escrita que contenga los fundamentos de la mutagénesis y su clasificación En el aula se discutirán	3	10, 16, 24, 43

<p>microorganismos en la producción de metabolitos.</p> <p>4.3.2. Aplicación de los agentes mutagénicos a los microorganismos para la producción de metabolitos (enzimas y antibióticos entre otros).</p> <p>4.3.3. Aislamiento de mutantes auxotróficas para la producción de metabolitos de interés industrial y de la salud.</p>	<p>Que el alumno conozca la aplicación de los agentes mutagénicos para la obtención de mutantes auxotróficas en la producción de metabolitos</p>	<p>artículos científicos donde se obtengan cepas mutantes productoras de algún metabolito</p>		
<p>4.4. Aplicación de la tecnología del ADN recombinante para la modificación genética de microorganismos.</p> <p>4.4.1. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos de microorganismos (ADN genómico y RNA total).</p> <p>4.4.2. Aplicación de las enzimas de restricción en la clonación del ADN.</p> <p>4.4.3. Técnicas básicas de biología molecular: reacción en cadena de la polimerasa, secuenciación, Southern blot, Northern blot, Western blot. RT-PCR, microarreglos.</p> <p>4.4.4. Vectores de clonación y expresión.</p> <p>4.4.5. Características generales de la clonación molecular.</p> <p>4.4.6. Organismos genéticamente</p>	<p>Que el estudiante conozca la tecnología del ADN recombinante para la modificación genética de microorganismos.</p> <p>Que el alumno se entienda las técnicas básicas de biología molecular y clonación.</p> <p>Que el estudiante se capacite para proponer su propia estrategia en la clonación de algunos organismos y tener perspectivas de las aplicaciones en la ingeniería genética.</p> <p>Que el alumno comprenda los diferentes sistemas de expresión homóloga y heteróloga de los microorganismos y la producción de proteínas recombinantes.</p>	<p>Se expondrá por equipo, las diferentes técnicas de biología molecular y habrá un apoyo de parte del profesor para la comprensión de las mismas por parte de los alumnos.</p> <p>En grupos de trabajo, el alumno discutirá y analizará la importancia de los microorganismos eucariontes, genéticamente modificados por ingeniería genética</p> <p>En equipos, el grupo discutirá y analizará las expresiones homóloga y heteróloga</p> <p>En grupos de trabajo, el alumno discutirá y analizará la producción de proteínas recombinantes en células procariontes y eucariontes</p>	<p>3</p> <p>4</p>	<p>10, 14, 16, 27, 44</p>

modificados, clonación en procariontes y eucariontes. 4.4.7. Sistemas de expresión homóloga y heteróloga. 4.4.8. Producción de proteínas recombinantes en células procariontes (<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>). 4.4.9. Producción de proteínas recombinantes en eucariontes (<i>S. cerevisiae</i>).				
			Número de sesiones	15

MODELOS EXPERIMENTALES PROGRAMADOS:

A lo largo del UEA y de forma paralela a la discusión de los contenidos teóricos y del proyecto de investigación, los alumnos desarrollarán los modelos experimentales que les permitirán familiarizarse con la metodología básica para el manejo de microorganismos y evaluación de su comportamiento durante un proceso de fermentación y de mejoramiento genético. Los modelos seleccionados son:

1. **Evaluación del crecimiento de un organismo procarionte y estudio de los mecanismos de inducción-represión enzimática.** El alumno planteará un modelo experimental para producir enzimas mediante un proceso fermentativo, y desarrollará habilidades y competencias para monitorear el crecimiento del microorganismo y la producción del metabolito (enzima) durante la fermentación
2. **Extracción, purificación y cuantificación de ADN genómico de un organismo procarionte.** El alumno desarrollará las habilidades y competencias necesarias para extraer, purificar y cuantificar el ADN del organismo procarionte propuesto en su trabajo de investigación,
3. **Estudio de las enzimas de restricción.** El alumno desarrollará las habilidades y competencias necesarias para realizar un análisis de restricción enzimática sobre el ADN genómico del microorganismo procarionte propuesto.

ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE *Kluyveromyces marxianus* Y DE LA INDUCCIÓN DE DIFERENTES ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS POR SUSTRATOS ESPECÍFICOS

Introducción: Uno de los principales productos biotecnológicos obtenidos para el servicio del ser humano son las enzimas, que tienen utilidad en procesos industriales, en medicina, en la industria farmacéutica, etc son las enzimas. Sin embargo, su producción está controlada por los sustratos que se requieren transformar, por lo que es necesario el estudio y la comprensión de la regulación de las vías metabólicas para incrementar la productividad de este metabolito.

El consumo de fuentes de energía por los microorganismos está regulado genéticamente por mecanismos de inducción-represión, que en las bacterias esta dado por un sistema simple, en cambio en levaduras es de una alta complejidad. De este modo, la célula se adapta a medios ambientes con determinadas fuentes de carbono, al inducir la expresión de enzimas que ayuden a la utilización de los azúcares que se encuentren, sin embargo, pueden ser también reprimidas cuando el microorganismo encuentra fuentes de carbono de fácil asimilación o con alta capacidad de producir energía (ATP).

Kluyveromyces marxianus es una levadura anaerobia facultativa, de interés industrial por las actividades enzimáticas que posee (Fonseca et al. 2008), así como por ser una cepa considerada segura (GRASS). Es la fuente para la obtención de la enzima β -galactosidasa (Bansal et al., 2008); excreta una β -fructofuranosidasa constitutiva con la cual se puede hidrolizar y fermentar polifruktanos, sacarosa, xilosa, galactosa, entre otras (de Paula et al., 2008). Durante su crecimiento aerobio puede fermentar la glucosa hasta su completa oxidación a CO₂, con una alta productividad celular.

Objetivo: Proponer el uso de desechos agroindustriales para la generación de biomasa y de β -galactosidasa o β -fructofuranosidasa de *K. marxianus* determinando los mecanismos de inducción y represión enzimáticas.

Objetivos de enseñanza aprendizaje:

- Que los equipos de investigación comprendan que los experimentos control en un proceso de investigación son importantes para distinguir si las respuestas a las preguntas que hacen a su objeto de estudio son significativas.
- Que los equipos de investigación sean capaces de proponer un sistema de inducción/represión de actividades enzimáticas.
- Que el equipo de investigación sea capaz de presentar sus resultados en un documento escrito y en seminario de grupo.
- Elabore un documento tipo artículo científico de los resultados de su investigación

Aprendizajes esperados de los alumnos:

- Analice la propuesta y la importancia de realizar experimentos diseñados como controles
- Proponga en base al modelo y a los contenidos teóricos del UEA, un objetivo de estudio de regulación de la actividad enzimática
- Seleccione la metodología adecuada para su proyecto
- Comprenda el fundamento de las técnicas analíticas que va a utilizar
- Utilice las técnicas usuales en sistemas de fermentación simples que se proponen en este documento
- Analice y presente los resultados por su relevancia

Materiales, equipo y reactivos

Materiales	Equipo	Reactivos
Cajas Petri Matraces Erlenmeyer de 250 ml y de 100 ml Pipetas de 1, 5 y 10 ml Micropipetas de 20-200 µl y de 100-1000 µl Termómetro de Laboratorio Algodón Gasa Tubos de ensaye (Conforme a las necesidades) Tubos Eppendorf (Conforme a las necesidades) Tubos cónicos de 15 ml para centrifuga	Autoclave Potenciómetro Incubadora Orbital Espectrofotómetro Centrifugadora refrigerada Estufa de 30 °C Balanza Granataria Balanza Analítica Micropipetas de 1000 y 100 µl Refrigerador 4 °C Congelador -4°C	Extracto de Levadura Glucosa Lactosa Hidróxido de Sodio Ácido Clorhídrico 3-5 DNS, ácido dinitrosalicílico Tartrato de Na y K Fenol Metabisulfito de Na Sulfato de cobre pentahidratado Carbonato de sodio Fenoil-Folin

Procedimiento experimental:

La metodología presentada es general de un proceso fermentativo para la producción enzimática, y servirá para que cada equipo de investigación proponga un modelo experimental que le permita estudiar los procesos de inducción o de represión de la β -galactosidasa o la β -fructofuranosidasa o bien, de alguna otra enzima cuya revisión bibliográfica justifique su empleo en el trabajo de investigación. A lo largo del mismo, los alumnos monitorearán el proceso de fermentación, cuantificando el crecimiento y la producción enzimática, para poder calcular los parámetros cinéticos de fermentación aprendidos en el UEA.

Microorganismo

Microorganismos de trabajo: *Kluyveromyces marxianus*, el alumno debe definir las condiciones ambientales de crecimiento.

Activación de las células

En un matraz de 100 ml de volumen con 50 ml de medio de cultivo que contiene 0.5% de extracto de levadura como fuente de nitrógeno y (1%) de glucosa, ajustar el pH a 5.5. Inocular un vial de la cepa seleccionada y dejar crecer por 24 hr a 28°C. Este será el cultivo de donde se partirá para los sistemas propuestos por el equipo de investigación.

Inóculo

Del matraz con células activadas, transferir 5 ml a un matraz de 100 ml con 50 ml del mismo medio de cultivo, al final utilizar un volumen de fermentación que sea con un tamaño de inóculo del 5%. Dejar incubar bajo las mismas condiciones durante toda la noche

Fermentación

Preparar un matraz de 250 ml con 100 ml de medio para cada uno de los siguientes medio de cultivo:

Medio de cultivo control (Manera y col., 2008):

Extracto de levadura	0.5%
Glucosa	1%
pH	5.5

Medio de cultivo para inducir la actividad enzimática:

Extracto de levadura	0.5%
Lactosa o sacarosa o la fuente alterna	1%
pH	5.5

Ambos medios esterilizarlos en autoclave a 10lb/plg² por 10 minutos

Los matraces de medio de cultivo deben contener un tapón de algodón para el intercambio de gases.

Para facilitar la comprensión del diseño experimental se presenta la siguiente tabla, con la propuesta de 5 tipos de medio de cultivo para el trabajo de investigación:

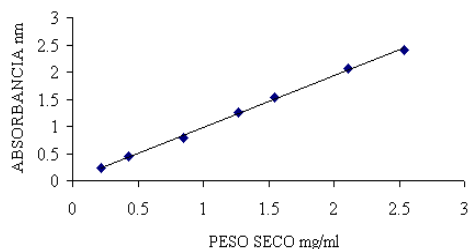
Medio No	Extracto de levadura (%)	Glucosa (%)	Lactosa (%)	Sacarosa (%)	Problema 1	2(%)	pH
1	0.5	1					5.5
2	0.5		1				5.5
3	0.5			1			5.5
4	0.5						5.5
5	0.5						5.5
A los matraces 4 y/o 5 se les agregará el inductor y/o represor que el equipo plantee en su investigación							

Inocular en los matraces de fermentación previamente esterilizados. El tamaño de inóculo será del 5% (v/v), como se mencionó anteriormente. Tomar muestras a partir del tiempo cero y posteriormente cada dos horas durante 8 horas.

Cada muestra será de un mínimo de 6 ml. Colocar Un ml en un tubo Eppendorf y congelar para medir posteriormente la concentración de azúcares reductores y la concentración de proteína; 2 ml para medir el pH (inmediatamente); Un ml para medir el crecimiento por DO a 660 nm y 2 ml que se centrifugan a 5000 rpm por 15 minutos para separar la biomasa del medio de cultivo, que servirá para cuantificar la actividad enzimática en las células y en el sobrenadante.

Determinación del crecimiento: En un tubo cónico de 15 ml colocar 1 ml de medio de cultivo. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos. Desechar el sobrenadante y agregar 5 ml de agua destilada al paquete celular. Resuspender las células y centrifugar nuevamente bajo las mismas condiciones. Después de la última lavada, desechar el sobrenadante resuspender las células en el mismo volumen que se tomo como muestra inicial. Leer la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm. Determinar el peso seco con base a la curva siguiente de peso seco vs densidad óptica

$$a = 0.9551 \quad b = 0.0255 \quad r^2 = 0.9987$$



Medición de la actividad enzimática

Para medir la actividad enzimática, es necesario determinar la concentración de azúcares reductores y de proteínas en la muestra a analizar. Posteriormente se puede medir la actividad. En seguida se muestran los procedimientos para ambas técnicas.

Determinación de azúcares reductores

Miller GL (1959)

Reactivos

NaOH	1.4 %	
3-5 DNS		0.75 %
Tartrato de Na y K	21.6 %	
Fenol	0.54 %	
Metabisulfito de Na	0.59 %	

Se disuelven los ingredientes en el orden arriba mencionado, en agua destilada, hasta completar la disolución de cada uno. Se agrega el volumen necesario de agua. Guardar en frasco ámbar y se deja reposar a temperatura ambiente por 24 h.

Se prepara una solución de glucosa (10mg/10 ml) para la realización de la curva estándar

Curva estándar de azúcares reductores

La curva estándar contempla concentraciones de 0 μ g hasta 1000 μ g de glucosa por ml

- Preparar una mezcla de reacción con un volumen final de 1.5 ml en agua destilada
- 3 ml del reactivo de DNS
- Hervir las muestras por 5 minutos
- Dejar enfriar a temperatura ambiente
- Llevar a volumen final de 20 ml con agua destilada

- Agitar y leer a 550 nm

Sol Std. Glucosa (ml)	Conc. Final Glucosa ($\mu\text{g/ml}$)	H ₂ O (ml)	DNS (ml)	H ₂ O (ml)
0.0	0	1	1.5	7.5
0.1	100	0.9	1.5	7.5
0.2	200	0.8	1.5	7.5
0.4	400	0.6	1.5	7.5
0.6	600	0.4	1.5	7.5
0.8	800	0.2	1.5	7.5
1.0	1000	0	1.5	7.5

Tenga presente que la concentración máxima de azúcar reductor que es lineal en esta curva es de 1000 $\mu\text{g/ml}$ y que el medio de cultivo puede tener un exceso de azúcar, contemple las diluciones que crea convenientes y prepare sus muestras problemas siguiendo el mismo procedimiento de un punto de la curva estándar.

Determinación de Proteínas

Lowry, O.H. et al. (1951).

Reactivos

Reactivo A: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% en agua

Reactivo B: tartrato doble de sodio y potasio al 2% en agua

Reactivo C: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N (4g NaOH + 20 g Na_2CO_3 en agua cb 1000)

Reactivo D: 1A + 1B = 1D

Reactivo E: 1D + 50C ó (0.5A + 0.5B + 50C)

Reactivo fenol folin dil 1:1

Sol std. Albúmina 1mg/ml. Pesar 10 mg para 10 ml de agua destilada. Tomar 0.3 ml de esta solución y agregar 2.7 ml de agua destilada para una solución de 100 $\mu\text{g/ml}$

Proceso

Colocar en un tubo alícuota de estándar de proteína

Llevar a 1 ml con agua destilada

Agregar 3 ml reactivo E y agitar vigorosamente

Dejar reposar 10 min. a T. ambiente

Agregar 0.3 ml reactivo fenol 1:1, agitar

Dejar reposar a T. amb.

Leer a 540 nm

Std albúmina (ml)	Conc. Final albúmina (µg/ml)	H ₂ O (ml)	Reactivo E (ml)	Folin 1:1 (ml)
0	0	1	3	0.3
0.125	12.5	0.875	3	0.3
0.250	25	0.750	3	0.3
0.500	50	0.500	3	0.3
0.750	75	0.250	3	0.3
1.0	100	0	3	0.3

Determinación de la concentración de proteínas y azúcares en las muestras de fermentación por muestra

Azúcares reductores:

Muestra (ml)	H ₂ O (ml)	DNS (ml)	Hervir 5 min Dejar a T. amb	H ₂ O (ml)
0.1	0.9	1.5		7.5

Leer a 550 nm. Calcular en base a los datos de la curva estandar la concentración de azúcares reductores

Proteínas

Muestra (ml)	H ₂ O (ml)	Reactivo E (ml)	Reposar a T. amb (min)	Reac Fenol folin (ml)	Reposar a T. amb (min)
0.1	0.9	3	10	0.3	30

Leer a 540 nm. Calcular en base a los datos de la curva estándar de proteínas

Con los datos de la curva estándar y la ecuación de la recta $Y=mX + b$, despejar el valor de X (concentración de problema) y multiplicar por el factor de dilución

Actividad enzimática

El objetivo es analizar cómo se induce la actividad enzimática de *K. marxianus* en el caldo de fermentación.

Se partirá de una solución estándar de lactosa o sacarosa (10mg/ml), de acuerdo al ejemplo de la siguiente tabla

Tubo #	Sol. Std (ml)	Caldo de fermentación (ml)	Muestra del tiempo 0 min (ml)	Muestra del tiempo 15min (ml)
1	1.0	0.1	0.1	0.1
2	1.0	0.1	0.1	0.1

A cada muestra, agregar lo necesario para medir los azúcares reductores al tiempo cero minutos y al tiempo 15 minutos. Esto se debe hacer rápidamente para evitar errores.

Cada equipo debe contemplar el material necesario que va a utilizar.

EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO DE *Escherichia coli*

Introducción. El ADN puede ser aislado de diferentes formas dependiendo si es cromosomal o extracromosomal. Para su extracción se requiere debilitar la pared bacteriana por congelación y descongelación o por tratamiento con lizosima y agentes quelantes como EDTA.

Para la extracción y purificación del ADN genómico se utiliza una mezcla de solventes orgánicos como fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción de 24:25:1. La lisis celular tanto de procariontes como eucariontes, se realiza con la adición de detergentes, como el dodecil sulfato de sodio (SDS). Después de la lisis se degrada el RNA con RNAsas y las proteínas utilizando proteasas. Las proteínas se extraen con solventes orgánicos como fenol, debido a que este solvente permite su desnaturalización, en tanto el ADN es recuperado de la fase acuosa y precipitado con etanol.

Objetivo: Utilizar como modelo de investigación experimental una cepa de *Escherichia coli* para la obtención de ADN genómico

Objetivos de enseñanza aprendizaje:

- Que los equipos de investigación comprendan que el material genético (ADN) es el responsable de transmitir la información genética de los seres vivos
- Aprendizajes esperados de los alumnos:
- Analicen la importancia de la extracción y purificación del ADN
- Relacionen la importancia que presenta una buena extracción y purificación de ADN en los diferentes experimentos que se realicen con él, ya sea en la identificación de microorganismos de interés industrial y de la salud, o en la identificación de genes.
- Comprendan el fundamento de las técnicas de extracción y purificación del ADN

Material y reactivos

Buffer de Lisis (Tris 0.1M pH 8.0, EDTA 0.1M, NaCl 0.15 M, SDS 10%)

Proteasa (10 mg/mL)

Fenol cloroformo alcohol isoamílico 24:25:1

Acetato de sodio 3M pH 5.4

Etanol absoluto

Etanol al 70% frío

Agua destilada estéril o TE pH 8.0

Procedimiento

Inocular una azada de la bacteria *Escherichia coli* en 10 mL del medio de cultivo BHI. Incubar 12 horas a 120 rpm y 36 °C. Posteriormente, tomar una alícuota de 5 mL del medio de cultivo incubado, y centrifugar a 6,000 rpm por 5 min. Remover completamente el medio de cultivo con la ayuda de una micropipeta o por decantación y resuspender la pastilla en 860 µL con buffer TE. Agregar 100 µL de SDS 10% más 40 µL de proteinasa K (20mg/ml), mezclar e incubar 1 h a 37°C. En campana de extracción, agregar 1 mL de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico [25:24:1] y agitar suavemente durante 30 seg. Centrifugar a 6000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Recuperar la fase acuosa (superior) en un tubo eppendorf nuevo estéril de 1.6 mL, agregar 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M con 2 volúmenes de etanol absoluto frío y almacenar a -20°C durante 30 min o toda la noche. Posteriormente, centrifugar a 12000 rpm durante 10 a 20 min en frío, decantar cuidadosamente el sobrenadante Agregar 500 µL de etanol al 70 %, mezclar y centrifugar nuevamente a 12000 rpm durante 20 a 30 min en frío, decantar cuidadosamente el sobrenadante y secar la última gota de la boca del tubo con una toalla de papel Dejar secar la pastilla al aire por 10 min. El

ADN se resuspende en 50 μ L agua de estéril o en amortiguador TE, pH 8 y se guarda a -20°C.

Para cuantificar el ADN, se descongela y se agita suavemente depositar 5 μ L en un tubo de 1.6 mL agregar 995 μ L de agua destilada, homogenizar por agitación suave y verter la solución en la celda de espectrofotometría. Ajustar a cero con 1,000 μ L de agua destilada como blanco (0% absorbancia). Hacer un barrido entre 230 nm y 320 nm. En caso de no poder realizar barridos, registrar los valores de absorbancia a 230 nm, 260 nm, 270 nm, 280 nm y 320 nm. Después de obtener la concentración de las muestras de ADN, hacer los cálculos necesarios para cargar 1 μ g de ADN por pozo en un gel de agarosa, conforme se describe a continuación.

Para verificar la integridad del ADN, preparar una solución de agarosa al 1% en un amortiguador de TAE. Una vez disuelta la agarosa se coloca en la placa formadora de geles, con el peine y se espera a que gelifique. Se retira el peine del gel y se coloca en la unidad de electroforesis horizontal, conteniendo el TAE, en caso necesario, se agregará lentamente más TAE, hasta cubrir el gel. Las muestras de ADN se mezclan con un amortiguador de carga (azul de bromofenol 0.25%, 0.25% de xilencianol 0.25%, glicerol 30% en agua) y se colocan en los pozos del gel, se conectan los electrodos a la fuente de poder y se corren las muestras en el gel durante 30 a 45 min a 100volts constantes. Se retira el gel y se tiñe en una solución de agua destilada estéril con SYBR® Green I durante 5 a 30 min. Posteriormente, el gel se observará en un transiluminador de luz ultravioleta a λ 260nm (utilizar lentes de seguridad).

Material y reactivos

Agarosa grado Biología Molecular

Amortiguador TAE 1x

Muestra de ADN

Solución de SYBR® Green 10,000

Cámara de electroforesis horizontal con fuente de poder

Micropipetas y puntas de 20 μ L

Parafilm

Hielo/contenedor

Horno de microondas

Transiluminador UV

Material

Muestras de ADN genómico

Espectrofotómetro UV-Vis

Celdas para espectrofotómetro (rango de ultravioleta, para volúmenes de 1 mL)

Agua destilada

Micropipetas y puntas de 20 y 1000 μ L

Tubos de 1.6 mL estériles

Hielo

ESTUDIO DE LA ACCIÓN DE LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Introducción: Las enzimas de restricción o endonucleasas de restricción son enzimas que reconocen secuencias de ADN específicas. Esto significa que cada enzima reconoce un sitio particular del ADN, es decir que reconoce una secuencia particular de nucleótidos. Esa secuencia específica para cada enzima se denomina “sitio de restricción”. Acorde a como realizan el corte, las enzimas se pueden clasificar en:

- ✓ Enzimas que generan “extremos romos” (parejos)
- ✓ Enzimas que generan “extremos cohesivos”

La especificidad de cada una de las enzimas de restricción puede ser considerada como la característica más interesante. Aún y cuando todas las enzimas de restricción se pueden unir a secuencias no específicas, bajo las condiciones adecuadas la diferencia de la velocidad de corte del sitio afín es muy alta con respecto a un sitio con menor afinidad. Sin embargo, en condiciones no óptimas, las velocidades de corte entre los sitios cambian fuertemente para muchas enzimas. Cada enzima de restricción tiene requerimientos específicos para alcanzar su actividad óptima. Las condiciones ideales de almacenamiento y de reacción favorecen una actividad mas eficiente y la mayor fidelidad en las funciones particulares de cada enzima. Condiciones como la temperatura, pH, utilización de cofactores, composición del amortiguador y la fuerza iónica afectan a la actividad y estabilidad enzimática.

Objetivo: Utilizar el ADN genómico de *Escherichia coli* como modelo de investigación experimental para determinar el sitio de corte de las enzimas de restricción

Objetivos de enseñanza aprendizaje:

- Que los alumnos sean capaces de diferenciar el efecto de corte de cada enzima de restricción en una cadena de ADN genómico
- Que los alumnos vean la importancia de utilizar diferentes tipos de enzima de restricción sobre una mismo ADN genómico
- Que los alumnos comprendan el mecanismo de acción de una enzima de restricción

Aprendizajes esperados de los alumnos:

- Propongan el mecanismo de acción de una enzima de restricción
- Seleccionen las enzimas de restricción que generen un mismo corte
- Comprendan el fundamento de la acción de las enzimas de restricción
- Propongan un modelo experimental para la aplicación de enzimas de restricción

Material y equipo

Agarosa grado Biología Molecular

Buffer TAEx (preparado)

Buffer de carga 5x

ADN genómico

Incubadora con temperatura controlada a 37°C

Vórtex

Tubos de 0.6 mL

Cámara de electroforesis horizontal

Fuente de poder

Micropipetas y puntas de 200 y 20 μ L
 Enzimas de restricción
 Buffer de restricción
 Marcadores de peso molecular
 Agua destilada estéril
 Hielo

Procedimiento

1. Rotular los tubos eppendor de 0.6 μ L, con el nombre de la enzima de restricción disponible y otro como control negativo (no lleva enzima de restricción).
2. Adicionar 1 μ g de ADN genómico a cada tubo
3. Calcular la cantidad de enzima de restricción, buffer y BSA (cuando sea necesario) que deben ser adicionadas a cada tubo. La concentración del buffer es de 10x, la concentración de la solución de la enzima es variable. Se necesitan 10 unidades de enzima por 1 μ g de ADN y de BSA se requieren 100 μ g/ml para cada reacción.
4. Calcular la cantidad de agua para obtener un volumen de reacción final de 30 μ l por tubo (tabla 1)
5. Mezclar los componentes suavemente para que se mezclen los componentes.

Tabla 1 Componentes para realizar la reacción con las enzimas de restricción

Número de tubo	Amortiguador 10x	Agua destilada estéril	BSA (1 mg/mL)	ADN	Enzima de restricción
----------------	------------------	------------------------	---------------	-----	-----------------------

6. Incubar los tubos de las reacciones a 37 °C (chechar la temperatura optima de la enzima que se va a utilizar) durante 2 h aproximadamente.
7. Preparar un gel de agarosa al 1% con TAE 1x.
8. Hacer la electroforesis de las reacciones de digestión
9. Evaluar la imagen del gel comparando las bandas obtenidas de cada reacción

Mecanismo de eliminación de residuos: actividades de desecho de materiales pertinentes con la noción de sustentabilidad

- Para los desechos biológicos: medio de cultivo líquido que contenga microorganismos, deberá ser esterilizado y desechado en la tarja. Cajas petri plásticas con medio sólido y crecimiento microbiano, serán colocadas en bolsas de residuos biológico-infecciosos y llevadas al incinerador del campus. material de vidrio: limpieza
- Para los desechos químicos (reactivo del DNS y de Lowry) Recolección en recipientes de plástico con tapa. Etiquetar con fecha y nombre del residuo.

Forma de presentación y discusión de resultados

A través de tres seminarios:

En el primero presentan un protocolo de investigación que contenga su propuesta de trabajo en el laboratorio, consistente en una introducción, una hipótesis, los objetivos, la metodología, un diagrama de flujo, la calendarización y la bibliografía (semana 2 y 3 del UEA).

En el segundo se presentan avances conteniendo los resultados con las propuestas de formato de los resultados para que se discuta en grupo (semana 8 y 9 del UEA)

En el tercero la presentación final del trabajo, consistente en una introducción, los objetivos, la metodología, los resultados, discusión, conclusiones y la bibliografía (semana 11 del UEA).

Bibliografía de la propuesta experimental

- Bansal S, Oberoi HS, Dhillon GS y Patil RT (2008). Production of beta-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on beta-galactosidase activity. *Indian Journal of Microbiology*. 48: 337-341
- de Paula FC, Cazetta ML, Monti R y Contiero J (2008). Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *Food Chemistry* 111: 691-695
- Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C y Gombert AK (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79: 339-354
- Sambrook J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.

- Manera AP, Ores JD, Ribeiro VA, Andre C, Burkert V y Kalil SJ (2008). Optimization of the culture medium for the production of beta-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082.
- Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Annalytical Chemistry* 31: 426-428
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. y Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry* 193: 265-273
- Squarezi C, Longo C, Ceni G, Boni G, Silva MF, Di Luccio M, Mazutti MA, Maugeri F, Rodrigues MI y Treichel H. (2009). Inulinase Production by Agro-Industrial Residues: Optimization of Pretreatment of Substrates and Production Medium. *Food and Bioprocess Technology* 2:409-414

BIBLIOGRAFÍA

1. Alan, W. J. (1985). *Handbook of enzyme biotechnology*. Ed. Wiley, USA.
2. Bailey, J. E. (1986). *Biochemical engineering fundamentals*. Ed. McGraw-Hill, USA.
3. Baldwin, T. (1990). *Chemical aspects of enzyme biotechnology fundamentals*. Ed. Plenum, USA.
4. Beck, R. W. (2000). *A Chronology of microbiology in historical context*. Ed. American Society for Microbiology, USA.
5. Brooker, R J. (1999). *Genetics: analysis and principle*. Ed. Addison-Wesley, USA.
6. Brooks, G. (1998). *Biotechnology in healthcare: an introduction to biopharmaceuticals*. Ed. Pharmaceutical Press, UK.
7. Carlberg, D. M. (2005). *Cleanroom microbiology for the non-microbiologist*. Ed. CRC Press, USA.
8. Cossart, P. (2000). *Cellular microbiology*. Ed. American Society for Microbiology, USA.
9. Dale, J. (2013). *Understanding microbes: an introduction to a small world*. Ed. Wiley-Blackwell, Chichester, UK.
10. Demain, A. L. (1999). *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. Ed. American Society for Microbiology, USA.
11. El-Mansi, M. (2007). *Fermentation microbiology and biotechnology*. Ed. CRC/Taylor & Francis, USA.
12. Fingerman, M. (2007). *Recent advances in marine biotechnology*. Ed. Science Publishers, USA.
13. Garrett, R A. (2007). *Archaea: Evolution, physiology, and molecular biology*. Ed. Blackwell Pub., USA.
14. Glick, Bernard R. (2003). *Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA*. Ed. American Society for Microbiology, USA.
15. Harisha, S. (2007). *Biotechnology procedures and experiments handbook*. Ed. Infinity Science Press, USA.
16. Hartl, D. L. (2012). *Genetics: analysis of genes and genomes*. Ed. Jones & Bartlett Learning, Burlington, USA.
17. Irwin H S. (1976). *Biochemical calculations*. Ed. Wiley, USA.
18. Julian D. y, W. S. Reznikoff. (1992). *Milestones in biotechnology: classic papers on genetic engineering*, USA.
19. Khanal, S K. (2008). *Anaerobic biotechnology for bioenergy production: Principles and applications*. Ed. Wiley-Blackwell, USA.
20. Krebs, J. E., E. S. Goldstein, S. T. Kilpatrick. Lewin. (2012). *Genes*. Ed. Médica Panamericana, México.
21. Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. (2001). *Brock biología de los microorganismos*, 8ª ed. Ed. Prentice Hall, México.
22. Montgomery D. C. (2001). *Design and analysis of experiments*. Ed. Wiley, USA.
23. Peleg, M. (2006). *Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems: models for predicting growth and inactivation*. Ed. Taylor & Francis, USA.
24. Snider, L. y W. Champness. (2007). *Molecular genetics of bacteria*. Ed. American Society for Microbiology, USA.
25. Stephanopoulos, G. N. (1998). *Metabolic engineering: principles and methodologies*. Ed. Academic Press, USA.
26. Voet D y J.G. Voet. (2003). *Biochemistry*. 3ª ed. Ed. John Wiley, USA.
27. Wu, W. (2011). *Gene biotechnology*. Ed. CRC Press, USA.
28. Griffiths, A. J. F. (2008). *Genética*. Ed. McGraw-Hill Interamericana, España.
29. Hanlon, G. (2013). *Essential microbiology for pharmacy and pharmaceutical science*. Ed. John Wiley & Sons, UK.
30. Hofkin, B. V. (2011). *Living in a microbial world*. Ed. Taylor & Francis, USA.

31. Johnson-G, P. (2002). *Introduction to food biotechnology*. Ed. CRC Press, USA.
32. Kulaev, I. S. (1985). *Environmental regulation of microbial metabolism*. Ed. Academic Press, UK.
33. Lamont, R. J. (2004). *Bacterial invasion of host cells*. Ed. Cambridge University Press, USA.
34. OECD. (2000). *The application of biotechnology to industrial sustainability*, Francia.
35. Pommerville, J.C. (2013). *Alcama's fundamentals of microbiology*. Ed. Jones and Bartlett, Sudbury, USA.
36. Ratledge, C. (2001). *Basic biotechnology*. Ed. Cambridge University Press, UK-USA.
37. Roy, D. (2010). *Biotechnology*. Ed. Alpha Science, UK.
38. Singleton, P. (2004). *Bacteria in biology, biotechnology, and medicine*. Ed. John Wiley & Sons, USA.
39. Staley, J. T. (2007). *Microbial life*. Ed. Sinauer Associates Sunderland, USA.
40. Stephanopoulos, G. (1993). *Bioprocessing*. Ed. Weinheim, Germany.
41. Storz, G. (2000). *Bacterial stress responses*. Ed. American Society for Microbiology, USA.
42. William M. F. y C. T. Kelly. (1990). *Microbial enzymes and biotechnology*. Ed. Elsevier, USA.
43. Zdenko V. y Z Hostalek. (1986). *Overproduction of microbial metabolites: strain improvement and process control strategies*. Ed. Butterworth, USA.
44. Zengler, K. (2008). *Accessing uncultivated microorganisms: from the environment to organisms and genomes and back*. Ed. American Society for Microbiology, USA.

Revistas científicas en línea de la UAM. <http://www.bidi.uam.mx>

- ✓ Applied and Environmental Microbiology.
- ✓ Biotechnology Advances.
- ✓ Biotechnology Letters.
- ✓ Enzyme and Applied Biotechnology.
- ✓ FEMS Microbiology Letters.
- ✓ Journal Applied Microbiology.
- ✓ Journal of Biotechnology.
- ✓ Letters in Applied Microbiology.
- ✓ Microbial Biotechnology.

MODALIDADES DE EVALUACIÓN

EVALUACIÓN GLOBAL

Se evaluará de acuerdo a los siguientes porcentajes:

Exámenes escritos	40 %
Trabajo de investigación	40 %
Participación	20 %

Para acreditar la UEA se requiere obtener el 60% en cada uno de los rubros mencionados.

MODALIDADES DE EVALUACIÓN DE RECUPERACIÓN.

El alumno será evaluado mediante las siguientes modalidades:

- a) En forma escrita de la totalidad de los contenidos de la UEA mediante examen escrito.
- b) Presentando una propuesta escrita del trabajo de investigación o experimental, referente al tema que se le asigne, demostrando su habilidad en el manejo de técnicas y cálculos (de ser el caso) e interpretación de resultados.

En caso de haberse cursado la UEA, podrá eximirse al alumno de la evaluación señalada en el punto 2), siempre y cuando hubiese obtenido una evaluación aprobatoria en la evaluación global.

En caso de no haber cursado la UEA, la evaluación comprenderá los dos elementos referidos anteriormente.

El derecho a la evaluación práctica estará sujeto a la aprobación de la evaluación escrita.

La calificación final será el promedio de los rubros anteriores siempre y cuando estos hayan sido aprobatorios. Si alguno de ellos es inferior al 60%, la calificación final será NA.