



FRONTERA BIOTECNOLÓGICA



Revista Digital del IPN, CIBA Tlaxcala - No. 9 Enero - Abril 2018



**ESTUDIO PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE REDUCTASAS
DE ORIGEN VEGETAL**

**ESPECTROSCOPIA DIELECTRICA
COMO HERRAMIENTA PARA EL
MONITOREO DE BIOPROCESOS**

**EL BRÓCOLI: SU IMPORTANCIA,
PROPIEDADES FUNCIONALES Y
BIODISPONIBILIDAD**

**TÉCNICAS MOLECULARES
COMO HERRAMIENTA PARA EL
ESTUDIO DE LOS PROCESOS
DE BIORREMEDIACIÓN DE
SUELOS CONTAMINADOS CON
HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO**

Directorio Institucional

IPN

Mario Alberto Rodríguez Casas

Director General

Hector Leoncio Martínez Castuera

Secretario General

Emmanuel Alejandro Merchán Cruz

Secretario Académico

Juan Silvestre Aranda Barradas

Secretario de Investigación y Posgrado

Luis Alfonso Villa Vargas

Secretario de Extensión e Integración Social

María Guadalupe Vargas Jacobo

Secretaria de Servicios Educativos

Reynold Ramón Farrera Rebollo

Secretario de Gestión Estratégica

Jorge Quintana Reyna

Secretario de Administración

Eleazar Lara Padilla

Secretario Ejecutivo de la Comisión de Operación

y Fomento de Actividades Académicas

José Cabello Becerril

Secretario Ejecutivo del Patronato de Obras e

Instalaciones

José Juan Guzmán Camacho

Abogado General

Modesto Cárdenas García

Presidente del Decanato

CIBA IPN

Myrna Solís Oba

Directora del CIBA IPN Tlaxcala

Raúl Jacobo Delgado Macuil

Subdirector Académico y de Investigación del CIBA IPN

Tlaxcala

Erik Ocaranza Sánchez

Subdirector de Vinculación del CIBA IPN Tlaxcala

Abdu Orduña Díaz

Subdirector de Innovación Tecnológica

del CIBA IPN Tlaxcala

David Guillermo Pérez Ishiwara

Miembro Fundador de Frontera Biotecnológica

Martha Bibbins Martínez

Editor en Jefe

Gonzalo Pérez Araiza

Soporte Técnico

Pedro Ramírez Calva

Diseño y Diagramación Frontera Biotecnológica

Ismael Sánchez González

Desarrollo Web

Lilia Espindola Rivera

Coordinadora Administrativa

CONTENIDO

MENSAJE EDITORIAL 3

EL BRÓCOLI: SU IMPORTANCIA,
PROPIEDADES FUNCIONALES Y
BIODISPONIBILIDAD 4

TÉCNICAS MOLECULARES COMO
HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE
LOS PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN
DE SUELOS CONTAMINADOS CON
HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO 10

ESTUDIO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
REDUCTASAS DE ORIGEN VEGETAL 17

ESPECTROSCOPIA DIELÉCTRICA COMO
HERRAMIENTA PARA EL MONITOREO DE
BIOPROCESOS 21

CINTILLO LEGAL

FRONTERA BIOTECNOLÓGICA, año 6, número 9, enero - abril 2018, es una publicación cuatrimestral editada por el Instituto Politécnico Nacional a través del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac - Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México. Tels.: 01-248-48707-65 y 66 Conmutador IPN: 57296000, Ext. 87816. <http://www.revistafronterabiotecnologica.cibatlaxcala.ipn.mx>, Editor responsable: Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo del Título No. 04-2015-120313501700-203, ISSN: 2448-8461, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor (INDAUTOR). Responsable de la última actualización de este número, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez., Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac - Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, fecha de última modificación, 27 de abril del 2018.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación.

Queda estrictamente prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización del Instituto Politécnico Nacional.

MENSAJE EDITORIAL

Abril del 2018

Estimados lectores,

En nuestra primera edición del 2018 de **FRONTERA BIOTECNOLÓGICA**, encontraran cuatro interesantes artículos.

En el primer artículo **“EL BRÓCOLI: SU IMPORTANCIA, PROPIEDADES FUNCIONALES Y BIODISPONIBILIDAD”** los autores hacen una revisión sobre el **BRÓCOLI**, hortaliza que se distingue por su valor nutricional y por la presencia de **COMPUESTOS BIOACTIVOS** con propiedades funcionales muy beneficiosas para la salud. Se destacan las propiedades anticancerígenas, las cuales se potencian con su contenido de vitamina A, C y E, aminoácidos, zinc y potasio. Por otra parte, sus propiedades antioxidantes ayudan a eliminar las toxinas, los radicales libres y el ácido úrico, purificando la sangre y la piel. De igual forma, se sabe que el consumo del **BRÓCOLI** favorece el fortalecimiento del sistema inmunológico, previene la anemia, la hipertensión y favorece la regulación de la glucosa en sangre. Por lo anterior, los autores concluyen que el consumo del **BRÓCOLI** así como los productos que puedan desarrollarse a partir de dicho vegetal, representan una nueva opción para la prevención y/o tratamientos de enfermedades crónicas degenerativas.

En el segundo artículo, **“TÉCNICAS MOLECULARES COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO”**, se presenta un panorama sobre las principales estrategias y técnicas moleculares que se han empleado para definir los mecanismos que utilizan los microorganismos presentes en el suelo, para degradar compuestos contaminantes como los **HIDROCARBUROS** del petróleo. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, por sus siglas en inglés) forman parte de la fracción pesada del petróleo y son considerados tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos afectando la salud de los seres vivos, por lo que el desarrollo de métodos de **BIORREMEDIACIÓN** eficientes, es de gran importancia. La aplicación de técnicas moleculares tales como la ingeniería genética, metagenómica, transcriptómica y proteómica en el área de la Biotecnología Ambiental, han permitido que los procesos de biorremediación sean factibles y mas eficientes.

El tercer artículo titulado, **“ESTUDIO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE REDUCTASAS DE ORIGEN VEGETAL”** se presenta el trabajo de investigación realizado para la obtención de alcohol bencílico utilizando **BIOCATALIZADORES** de origen vegetal. La **BIOCATALISIS** es un área de gran importancia dentro de la Biotecnología, la cual ha permitido la aplicación de las enzimas en un amplio número de industrias dedicadas a la fabricación de diversos compuestos químicos, fármacos, así como alimentos o biocombustibles. Las enzimas sin duda representan una alternativa más eficiente y a la vez más ecológica a la química sintética tradicional, ya que los procesos que catalizan transcurren a través de reacciones en medios menos agresivos con el medio ambiente y bajo condiciones de pH y temperatura suaves y con menor costo económico. En este trabajo se evaluó la actividad de deshidrogenasas (reductasas) de diferentes fuentes vegetales, para obtener alcohol bencílico a partir de benzaldehído.

Finalmente el cuarto artículo, **“ESPECTROSCOPIA DIELECTRICA COMO HERRAMIENTA PARA EL MONITOREO DE BIOPROCESOS”** se expone la importancia de esta técnica en los campos de la caracterización, análisis y monitoreo celular en **BIOPROCESOS**. Esta tecnología ocupa un lugar importante entre los modernos métodos de medición utilizados para el análisis físico y químico de materiales así como de células y tejidos, en numerosos campos de investigación, entre ellos, medicina, industria farmacéutica, ciencia de materiales, tecnología de alimentos y tecnología de fermentaciones. Su principio se basa en la interacción de un campo externo con un momento dipolar eléctrico de la muestra.

Los autores resaltan que la **ESPECTROSCOPIA DIELECTRICA** ha resultado útil para el monitoreo en tiempo real de cultivos celulares, debido a que permite el monitoreo de células vivas en suspensión e inmovilizadas de manera no invasiva, ni destructiva.

Los invitamos a leer y a compartir con otros investigadores, estudiantes, trabajadores y público en general, esta edición tan interesante de **FRONTERA BIOTECNOLÓGICA**.

“LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA”.

Dra. Martha Bibbins Martínez
Editor en jefe



EL BRÓCOLI: SU IMPORTANCIA, PROPIEDADES FUNCIONALES Y BIODISPONIBILIDAD

Vázquez-González C.^{1,2}, Robles-López M.R.¹, García-Meza, M. G.¹, Rivera-Hernández K.N.¹, Villa-Ramírez M.S. y Ramírez-López, C.¹

¹Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. ExHacienda San Juan Molino. Carretera Estatal, Tecuexcamac-Tepetitla Km. 1.5, Tlaxcala. C.P. 90700. México. crl81@hotmail.com

²Universidad Tecnológica de Tecamachalco. Av. Universidad Tecnológica Núm. 1 Col. Barrio La Villita. Tecamachalco, Puebla. C.P. 75483. México. c-v-g@hotmail.com

RESUMEN

El brócoli (*Brassica oleraceae* var. *italica* Plenck) es una hortaliza con un alto valor nutricional. Las condiciones ambientales para su cultivo al aire libre provocan que esté sometido a períodos de estrés durante su desarrollo, lo que conlleva a la activación de rutas metabólicas secundarias como mecanismos de defensa y a la síntesis de compuestos bioactivos que incluyen compuestos nitrogenados, azufrados, terpenicos y fenólicos. Al respecto, existe evidencia que señala la poderosa actividad antioxidante de estos compuestos contra radicales libres e incluso que su consumo resulta beneficioso para la salud toda vez que pueden proporcionar un efecto preventivo contra algunos tipos de cáncer. En el presente artículo se hablará de diversas investigaciones en torno a la funcionalidad y biodisponibilidad de compuestos presentes en el brócoli, que lo convierten en una excelente alternativa para satisfacer las actuales demandas de consumidores que buscan conseguir a partir de los alimentos la prevención de enfermedades o simplemente mantener un estado de salud óptimo.

Palabras clave: brócoli, biodisponibilidad, glucosinolatos, isotiocianatos.

ABSTRACT

Broccoli (*Brassica oleraceae* var. *italica* Plenck) is a vegetable with a high nutritional value. The environmental conditions for outdoor cultivation cause it to be subjected to periods of stress during its development, which leads to the activation of secondary metabolic pathways as mechanisms of defense and active the synthesis of bioactive compounds that include nitrogen derivatives, sulfur, terpene and phenolic. In this regard, there is evidence that indicates a high antioxidant activity of these compounds against free radicals and even that their consumption is beneficial for health since they can provide a preventive effect against some types of cancer. In the present article we will talk about several researches about the functionality and bioavailability of compounds present in broccoli, which make it an excellent alternative to meet the current demands of consumers seeking to obtain from food the prevention of diseases or simply maintain an optimal state of health.

Keywords: broccoli, bioavailability, glucosinolates, isothiocyanates.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen diversas evidencias científicas sobre la abundancia de sustancias fitoquímicas que contienen los alimentos, siendo los vegetales los responsables de sintetizarlas. La industria alimentaria a nivel nacional e internacional, en el sector de los llamados “alimentos funcionales”, ha presentado una mayor demanda por consumidores cada vez más conscientes y responsables del tipo de alimentación por una parte, y por otra, aquellos que los requieren debido al padecimiento de enfermedades crónicas degenerativas (Vallejo et al., 2002; Herr et al., 2010; Dominguez-Perles et al., 2010). En relación a esto, existen diversas investigaciones sobre el estudio de compuestos funcionales presentes en el brócoli y los factores que afectan su concentración, biodisponibilidad y capacidad antioxidante (Hwang et al., 2013; Deng et al., 2015; Cai et al., 2016). Consecutivamente, se explica el papel que juegan los compuestos funcionales que se originan e inclusive el proceso para metabolizarlos “in situ” e “in vivo”, para producir compuestos funcionales tales como los isotiocianatos, responsables de prevenir o tratar enfermedades crónicas como el cáncer (Saha et al., 2012). También se reportan estudios sobre compuestos fenólicos, carotenoides, clorofila, ácido ascórbico, flavonoides y tocoferoles presentes en el brócoli. En base a lo anterior, el objetivo de la presente revisión bibliográfica es dar a conocer la importancia del consumo del brócoli, a través de las investigaciones que se han realizado sobre los compuestos de interés funcional, así como los factores que afectan su actividad y biodisponibilidad.

1.1 Orígenes del brócoli.

El nombre científico del brócoli es *Brassica oleraceae* L. var. *italica* Plenck, la clasificación taxonómica se presenta en la Tabla 1. Este género también incluye un gran número de vegetales que son cultivados para el consumo de sus inflorescencias, tallos frescos y raíces o bien para la extracción de aceite de sus semillas. Es originaria de las costas del Mediterráneo y Asia Occidental y fue introducida a Europa, principalmente a Italia en épocas medievales (Latté et al., 2011). En México se estima que su cultivo inició en los años 70's debido a su alta rentabilidad y al cambio hacia hábitos de consumo sano.

Tabla 1. Clasificación Taxonómica del brócoli

Subdivisión	Angiospermas
Clase	Dicotiledónea
Orden	Brasicales
Familia	Brasicáceas
Género	Brassica
Especie	Oleracea
Variedad	Italica
Nombre trinomial	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> .

Las principales partes comestibles del brócoli son los brotes y las flores llamadas inflorescencia (Figura 1).

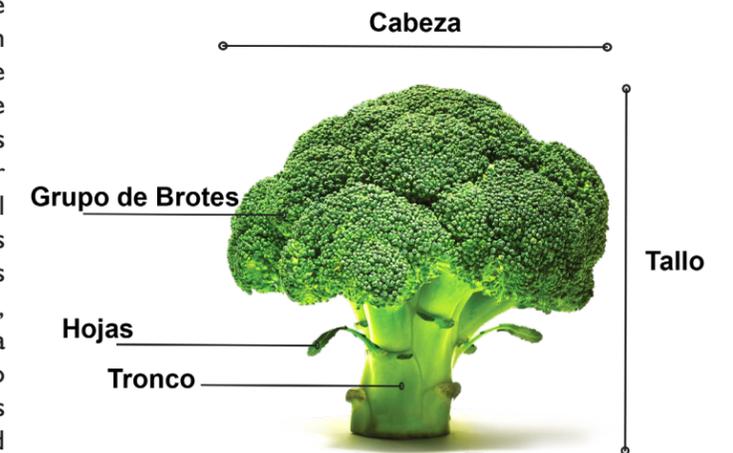


Figura 1. Diagrama de florete de brócoli (*Brassica oleraceae* L. var. *italica*).

1.2 El cultivo de brócoli y su importancia económica en México.

Sus demandas climáticas lo hace un cultivo apto para zonas de clima templado y frío, tolerando temperaturas de hasta -2°C, siendo 17°C la temperatura óptima de desarrollo, prefiere suelos con textura arenosa, uniformes, profundos con buenas condiciones de humedad y drenaje y con un pH óptimo de 6 a 7.5 (SIAP, 2017). De acuerdo a la FAO en 2014, los productores principales de brócoli fueron: China con el 41.20% en primer lugar, seguido por India con el 35.40%, España con el 2.43% y México ocupa el 4to lugar a nivel mundial en la producción de brócoli con 2.16%, Italia con el 1.71%, Francia con el 1.52% y el 15.58% correspondería a otros países del mundo. El SIAP 2017 reporta a nivel nacional que los principales cinco estados productores de brócoli en orden descendente son: Guanajuato, Michoacán, Puebla, Jalisco y Sonora. Con respecto al comercio exterior, cabe mencionar que 7 de cada 10 toneladas de brócoli que se producen en México se exportan, siendo los principales destinos Estados Unidos, Canadá y Japón, flujo que en 2016 generó un valor comercial de 390 mdd.



2. PROPIEDADES FUNCIONALES Y BIODISPONIBILIDAD

2.1 Características nutricionales del brócoli.

La porción comestible de brócoli crudo aporta por cada 100 g un alto contenido de agua (89.30%) y bajo en grasa (0.37%). Otros componentes son proteínas (2.82%), fibra dietética total (2.60%) e hidratos de carbono (6.64%). Es una rica fuente de minerales como potasio, fósforo, calcio y sodio. Además el brócoli proporciona vitaminas especialmente vitamina C, vitamina A y ácido fólico (Departamento de Agricultura de EE.UU. 2016). Campas-Baypoli y col. (2009) obtuvieron harina de brócoli proponiéndola como una fuente de nutrientes y con la posibilidad de utilizarse como suplemento dietético, dado el alto contenido de aminoácidos como tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, prolina y valina. Así como la presencia de ácidos grasos como el ácido linoléico, ácido palmítico y ácido linoleico.

2.2 Compuestos con características funcionales presentes en el brócoli.

De manera general, las brassicáceas son consideradas alimentos funcionales. En la Figura 2 se presenta un esquema comparativo entre alimento, alimento funcional y nutraceutico. Los alimentos funcionales se definen como “aquellos alimentos que consumidos en la dieta en las cantidades normales, ya sea de forma natural o procesada, contienen componentes biológicamente activos que ejercen efectos beneficiosos para la salud que van más allá de la nutrición”. En tanto que un compuesto nutraceutico puede definirse como “un suplemento dietético, presentado en una matriz no alimentaria (píldoras, cápsulas, polvo), de una sustancia natural bioactiva concentrada, presente usualmente en los alimentos y que, tomada en dosis superior a la existente en esos alimentos, presumiblemente, tiene un efecto favorable sobre la salud mayor que el que podría tener el alimento normal” (Blades, 2000).

Dentro de los compuestos fitoquímicos más importantes en el brócoli están los glucosinolatos y sus productos de degradación, los isotiocianatos (Latté et al., 2011). El brócoli es la principal fuente natural de sulforafano, su precursor glucorafanina constituye entre el 81-88 % de los glucosinolatos totales de este vegetal. Los glucosinolatos (GL) no son biológicamente activos hasta que se hidrolizan (Figura 3) por la acción de la enzima endógena mirosinasa (β -thioglucosidasa) cuando el tejido del vegetal se rompe a consecuencia de un daño mecánico (por corte o masticación) o cuando la enzima mirosinasa también presente en microflora intestinal se pone en contacto con el sustrato GL

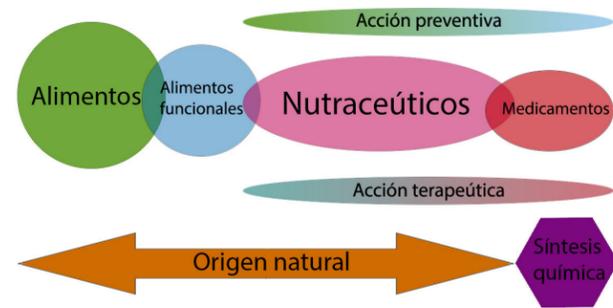


Figura 2. Descripción gráfica de la relación entre alimentos, alimentos funcionales y nutraceuticos.

y libera glucosa, bisulfato y aglucona. Posteriormente, esta última experimenta un acomodo intramolecular que genera isotiocianatos, nitrilos, metilisotiocianatos, metilnitrilos y tiocianatos (todos de bajo peso molecular), los cuales son responsables del aroma y olor típico de estos productos debido a la presencia del enlace disulfuro (Aires et al., 2012; Chuanphongpanich et al., 2006; Soares et al., 2017).

Este incremento en la concentración de glucosinolatos, se observa por ejemplo cuando después de la cosecha,

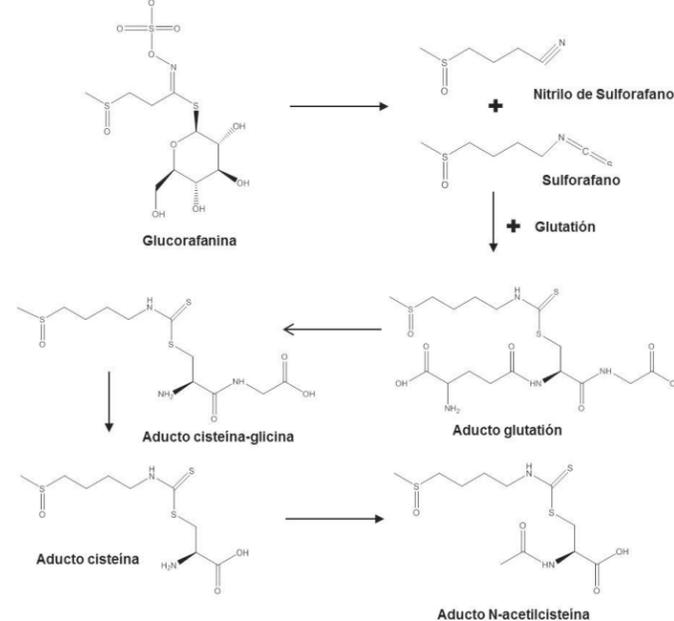


Figura 3. Ruta de degradación de glucosinolatos a través de la ruta metabólica del ácido mercaptúrico (adaptado de Saha et al., 2012).

las cabezas de brócoli se cocinan durante dos minutos con vapor de agua y luego se almacenan a temperaturas menores de 4°C y alta humedad relativa (Jones et al., 2006). En un estudio realizado por Campas-Baypoli et al. (2009), donde se analiza el contenido de sulforafano entre las diferentes partes de la planta de brócoli

(Tabla 2), se observa que existen variaciones en el contenido de sulforafano dependiendo del tejido analizado.

Tabla 2. Contenido de sulforafano ($\mu\text{g/g}$ peso seco en brócoli)

Cabeza	Inflorescencia	Tallo	Hoja	Cabeza entera
1	448.35	250.58	313.91	195.30
2	513.69	202.33	495.86	267.28
3	218.93	154.43	239.04	108.82
4	634.02	234.62	430.71	297.68
5	683.27	231.82	437.50	359.02
Promedio	499.65±183	214.75±38	383.40±104	246.21±97

Fuente: Adaptado de Campas-Baypoli et al., 2009

No obstante, el tipo y concentración de compuestos funcionales presentes en el brócoli así como su capacidad antioxidante, es afectada por diversos factores; entre los que destacan la variedad de la planta, estado de madurez, condiciones de cultivo, condiciones de manejo post-cosecha y formas de consumo. (Vallejo et al., 2002; Gliszczynska-Swiglo et al 2006; Aires et al., 2012; Alanís-Garza et al., 2015).

Borges-Márques et al. (2004) y Galgano et al. (2007) señalan que el ácido ascórbico es uno de los fitonutrientes más importantes en el brócoli, sin embargo esta vitamina es sensible a la oxidación química y enzimática, así como soluble en agua y se utiliza como indicador en el monitoreo de la calidad. Se ha demostrado que el brócoli en fresco tiene una calidad superior, comparado con el brócoli ultracongelado, además puede disminuir si no se consume inmediatamente después de ser adquirido, también la técnica de cocción determina la calidad del brócoli, así como un volumen excesivo de agua puede llevar a disminuir el contenido de vitaminas.

Otros compuestos de interés son los fenólicos, carotenoides, clorofila, ácido ascórbico, flavonoides y tocoferoles. En la Tabla 3, se resumen algunas investigaciones sobre la función de compuestos funcionales de interés, presentes en el brócoli.

2.3 Biodisponibilidad.

Cuando hablamos de la cantidad realmente absorbida y metabolizada hablamos de biodisponibilidad. Hwang et al. (2013) señalan que los compuestos de promoción de la salud en el brócoli se ven afectados significativamente por métodos de calentamiento, sin embargo con el proceso de calentamiento adecuado pueden aumentarse las concentraciones de glucosinolatos, carotenoides y tocoferoles. Por otro lado determinaron que los tratamientos de calentamiento reducen las concentraciones de glucosinolatos pero aumentan los

Tabla 3. Estudios en relación a los componentes funcionales de interés en brócoli.

Compuesto	Función	Referencia
Isotiocianatos (ITC), tiocianatos y nitrilos (sulforafano)	Anticancerígeno	Latté et al., 2011. Soares et al., 2017. Campas-Baypoli et al., 2009. Herr and Büchler 2010.
Compuestos fenólicos	Anticancerígeno	Fahey et al., 2016. Zhang, et al., 2004
Carotenoides y clorofilas (Neoxantina, violaxantina, clorofila b, luteína, clorofila a, trans- β -cryptoxanthina, trans- β -caroteno).	Antioxidantes	Alanís-Garza et al., 2015. Hwang et al., 2013. Cai et al., 2016. Zhang, et al., 2004.
Ácido ascórbico	Antioxidante	Borges-Márques et al., 2004. Galgano et al., 2007. Gliszczynska-Swiglo et al., 2006. Kaur et al., 2007 Muntyaka et al., 2010. Zhang, et al., 2004
Flavonoides	Antioxidante	Dominguez-Perles et al., 2010 Gliszczynska-Swiglo et al., 2006. Vallejo, et al., 2004.
Tocoferoles	Anticancerígeno Antioxidante	Hwang et al., 2013.

de carotenoides y tocoferoles. Los tratamientos con microondas y vapor tuvieron efectos mínimos sobre las concentraciones de glucosinolatos, carotenoides y tocoferoles, sin embargo, la ebullición aumentó la pérdida de los mismos, concluyendo que la facilidad de extracción química también podría traducirse en una mayor biodisponibilidad.

Saha y col. (2012) señalan que el brócoli es comúnmente adquirido en fresco o congelado y antes de ser consumido, se cocina. En su estudio los autores compararon la biodisponibilidad y el metabolismo del sulforafano en dieciocho voluntarios sanos, encontrando la presencia significativa en orina de un compuesto conjugado de la erucina N-acetilcisteína, además que la microbiota intestinal puede producir sulforafano, erucina y sus nitrilos a partir de glucorafanina, siguiendo la ruta de degradación o metabolismo ejemplificada en la Figura 3, previamente discutida.

3. CONCLUSIONES

Es indiscutible que el brócoli tiene una gran importancia nutricional en la actualidad, que en cada una de las secciones de la hortaliza (tallos, inflorescencia y hojas) contiene compuestos con propiedades funcionales que pueden proporcionar grandes beneficios a la salud de los seres humanos, atribuyéndose principalmente al magno aporte de compuestos bioactivos (principalmente isotiocianatos). Dentro de las nuevas investigaciones se puede concebir al brócoli, así como los productos que puedan desarrollarse a partir de dicha Brassica,

como una nueva opción que contribuya a la prevención y/o tratamientos de enfermedades crónicas degenerativas, tales como el cáncer. Finalmente, es definitivo que un reto fundamental para los biotecnólogos y la industria alimentaria será el poder también comercializar de manera efectiva dichos alimentos funcionales, pero también para el cuerpo científico sigue siendo un reto aportar evidencias científicas sobre la biodisponibilidad de dichas sustancias, así como demostrar el impacto positivo para la salud de la población en el mundo.

4. AGRADECIMIENTOS

La autora, Cecilia Vázquez-González agradece a la Universidad Tecnológica de Tecamachalco (UTT) y a la empresa Agroindustria de Brócoli Poblana S.A. de C.V. (AGROIBPSA), por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo en el marco del programa de Doctorado en Biotecnología Productiva del CIBA-IPN.

5. REFERENCIAS

Aires, A., Carvalho, R., Rosa, E. 2012. Glucosinolate composition of brassica is affected by postharvest, food processing and myrosinase activity. *Journal of Food Processing & Preservation*, 36 (3):214-224.

Alanís-Garza, P.A., Becerra-Moreno, A., Mora-Nieves, J.L., Mora-Mora, J.P. & Jacobo-Velázquez, D.A. 2015. Effect of industrial freezing on the stability of chemopreventive compounds in broccoli. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(3): 282-288.

Blades, M. 2000. Functional foods or nutraceuticals. *Nutrition & Food Science*, 30(2):73-76.

Borges-Marques, R.M., Von Atzinge, M.C. & Machado Pinto e Silva, M.E. 2004. Sensory evaluation and ascorbic acid of frozen and fresh vegetables. *Revista Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4:240-245.

Campas-Baypoli, O.N., Sánchez-Machado, D.I., Bueno-Solano, C., Nuñez-Gastelum, J.E., Reyes-Moreno, C., & López-Cervantes, J. 2009. Biochemical composition and physicochemical properties of broccoli [ours. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(S4):163-173.

Cai, C., Miao, H., Qian, H., Yao, L., Wang, B., & Wang, Q. 2016. Effects of industrial pre-freezing processing and freezing handling on glucosinolates and antioxidant attributes in broccoli florets. *Food Chemistry*, 210:451-456.

Chuanphongpanich, S. & Phanichphant, S. 2006. Method and determination of phenolic compounds in broccoli seeds samples. *Chiang Mai Journal Science*, 33(1):103 -17.

Domínguez-Perles, R., Martínez-Ballesta, M. C., Carvajal, M., García-Viguera, C. and Moreno, D. A. 2010. Broccoli-Derived By-Products—A Promising Source of Bioactive Ingredients. *Journal of Food Science*, 75:C383-C392.

Fahey, J.W. 2016. Brassica: Characteristics and Properties. *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, Oxford, Pages 469-477. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00083-0>. Último acceso: 22/11/2017

Galgano, F., Favati, F., Caruso, Pietrafesa, M.A. and Natella, S. 2007. The Influence of Processing and Preservation on the Retention of

Health-Promoting Compounds in Broccoli. *Journal of Food Science*, 72(2):S130-S135.

Gliszczynska-Swiglo, A.E., Ciska, A.E., Pawlak-Iemanska, K., Chmielewski, J., Borkowski, T. & Tyrakowska, B. 2006. Changes in the content of health-promoting compounds and antioxidant activity of broccoli after domestic processing. *Food Additives and Contaminants*, 23(11):1088-1098.

Hwang Eun-Sun & Kim, Gun-Hee. 2013. Effects of various heating methods on glucosinolate, carotenoid and tocopherol concentrations in broccoli. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(1):103-111.

Herr, I. & Büchler, L.W. 2010. Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: Implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 36(5):377-383.

Jones, R.B., Faragher, J.D., Winkler, S. 2006. A review of the influence of postharvest treatments on quality and glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) heads. *Postharvest Biology and Technology*, 41:1-8.

Kaur, Ch., Kumar, K., Anil, D. & Kapoor, H.C. 2007. Variations in antioxidant activity in broccoli (*Brassica oleracea* L.) cultivars. *Journal of Food Biochemistry*, 31:621-638.

Latté, P.K., Appel, K.E. & Lampen, A. 2011. Health benefits and possible risks of broccoli – An overview. *Food and Chemical Toxicology*, 49:3287-3301.

Munyaka, A. W., Makule, E. E., Oey, I., Van Loey, A. & Hendrickx, M. 2010. Thermal Stability of L-Ascorbic Acid and Ascorbic Acid Oxidase in Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Journal of Food Science*, 75: C336-C340. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01573.x

Saha, S., Hollands, W., Teucher, B., Needs, P.W., Narbad, A, Ortori, C.A., Barret, D.A., Rossiter, J.T., Mithen, R.F & Kroon, A. 2012. Isothiocyanate concentrations and interconversion of sulforaphane to erucin in human subjects after consumption of commercial frozen broccoli compared to fresh broccoli. *Molecular Nutrition Food Research*, 56:1906-1916.

Soares, A., Carrascosa, C. & Raposo, A. 2017. Influence of Different Cooking Methods on the Concentration of Glucosinolates and Vitamin C in Broccoli. *Food & Bioprocess Technology*, 10(8):1387-1411.

SIAP, 2017. <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Estudios/Documents/monografias/broccoli.pdf>. Último acceso: 22/10/2017.

Vallejo, F., Tomás-Barberán, F. & García-Viguera, C. 2002. Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *Journal of Science of Food Agriculture*, 82:1293-1297.

Vallejo, F., Tomas-Barberan, F.A. & Garcia-Viguera, C. 2004. Characterization of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1054:181-193.

Zhang, D. y Hamauzu Y. 2004. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chemistry*, 88(4), 503-509



TÉCNICAS MOLECULARES COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO

Rita Karen Pacheco Cabañas¹, José Armando Macías Cervantes¹, Nuvia Sosa Díaz¹, Armado Hernández Carro¹, Georgina Cortés Ramírez¹, Angel E. Absalón Constantino¹ y Diana V. Cortés-Espinosa^{1*}.

¹Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala, México, C.P. 90700.

dcortes@ipn.mx

RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, por sus siglas en inglés) forman parte de la fracción pesada del petróleo y son considerados tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos afectando la salud de los seres vivos por su acumulación las partículas del suelo, por lo que son contaminantes ambientales prioritarios. La biorremediación es una tecnología eficiente, económica y amigable con el ambiente en comparación con otras tecnologías, la cual es usada para la degradación de PAHs en suelos contaminados, a través de los procesos metabólicos de los microorganismos. Sin embargo, se desconocen los detalles de los mecanismos de degradación utilizados por los microorganismos, por lo que las técnicas moleculares se han convertido en una herramienta importante para el estudio de los procesos de biorremediación. Este artículo resume la aplicación de estas técnicas en el área de Biotecnología Ambiental, tales como la ingeniería genética, metagenómica, transcriptómica y proteómica, las cuales han permitido desarrollar procesos de biorremediación más eficientes.

Palabras clave: biorremediación, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), metagenómica, transcriptómica, proteómica.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are part of the heavy fraction of crude oil and they are considered toxic, mutagenic and carcinogenic, affecting the health of living beings due to their accumulation of soil particles, therefore they are considered priority environmental pollutants. Bioremediation is an efficient, economical and environmentally friendly technique compared to other technologies, which is used for degradation of PAHs in contaminated soils, through the metabolic processes of microorganisms. However, the details of the degradation mechanisms used for microorganisms are unknown, so molecular techniques have become an important tool for the study of bioremediation processes. This article summarizes the application of these techniques in the area of Environmental Biotechnology, such as genetic engineering, metagenomics, transcriptomics and proteomics, which have developed more efficient bioremediation processes.

Keywords: Bioremediation, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), metagenomic, transcriptomic, proteomic.

INTRODUCCIÓN

La diversidad de sustancias químicas que existe en la actualidad, ha servido para mejorar significativamente el nivel de vida de la población, sin embargo también han generado un importante problema de contaminación por su liberación al medio ambiente causando un efecto sobre la salud humana. Existen en el ambiente diferentes tipos de moléculas xenobióticas como los hidrocarburos del petróleo, pesticidas, bifenilos policlorados, entre otras que contaminan aguas, suelos y sedimentos (Abdel-Shafy y Mansour, 2016).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (de sus siglas en inglés, PAHs), son moléculas que forman parte de la fracción aromática del petróleo crudo. Están formadas por anillos aromáticos y son catalogadas como altamente tóxicas y persistentes en el suelo debido a que presentan características teratogénicas, mutagénicas y carcinogénicas para los seres vivos (Keith, 2015). Este hecho ha llevado a la búsqueda de técnicas para la remediación de suelos contaminados con PAHs de manera eficientes y económicas. Existen técnicas fisicoquímicas y las biológicas enfocadas a reducir la toxicidad y movilidad. Los métodos convencionales de remediación de suelos, buscan la eliminación, alteración o aislamiento del contaminante, los cuales son caros y solo transfieren el contaminante de una fase a otra. Por otro lado, los métodos biológicos como la biorremediación, han mostrado gran interés, ya que son económicos y amigables con el ambiente, debido a que aprovecha los procesos metabólicos de microorganismos nativos del suelo para la degradación de estos compuestos. Cuando la microbiota nativa es estimulada por la adición de nutrientes y por ajuste de condiciones ambientales, se conoce como bioestimulación. Para acelerar el proceso de biodegradación, se pueden adicionar microorganismos exógenos de forma individual o en consorcio, que han sido previamente seleccionados por sus características degradadoras y acondicionados en el laboratorio para su eficiente degradación (bioaumentación) (Kuppusamy et. al, 2017).

Los beneficios del uso de consorcios para la bioaumentación se han discutido ampliamente, ya que pueden compartir pasos bioquímicos para mineralizar los compuestos tóxicos. Algunos estudios indican que el uso de consorcios para la degradación de PAHs ha sido más eficientes en comparación con cepas individuales (Zafra et. al, 2017). Sin embargo, se desconocen los detalles del proceso de degradación de los PAHs, como las enzimas que intervienen, los microorganismos activos en el proceso, las interacciones que existen entre la microbiota nativa y los consorcios bioaumentados. Es por ello, que las técnicas moleculares se han convertido en una herramienta

importante en la Biotecnología Ambiental, ya que a través de estas podemos realizar seguimiento e identificación de poblaciones microbianas (metagenómica), establecer las rutas metabólicas de degradación (metaproteómica) y análisis de los cambios provocados en la expresión genética por la presencia de los PAHs (transcriptómica). También se pueden realizar mejoramientos genéticos para poder incrementar la capacidad de degradación de los microorganismos para obtener procesos más eficientes (Cortés-Espinosa et. al, 2012). El objetivo de este trabajo es mostrar la importancia de las técnicas moleculares en el área de Biotecnología Ambiental para el desarrollo de procesos de biorremediación de suelos contaminado.

I. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE SUELOS CONTAMINADOS

La identificación y clasificación de microorganismos aislados de sitios contaminados son de suma importancia para la construcción de consorcios microbianos usados como inóculo en la bioaumentación de suelos contaminados, para lo cual se han desarrollado técnicas para identificar taxonómicamente a los microorganismos mediante el análisis de los genes rRNA 16S (bacterias), y para hongos el rRNA 18S, 5.8S y 28S, que cuentan con dos espaciadores: ITS1 e ITS2 (Fig. 1), los cuales tiene una secuencia conservada que brinda información filogenética y taxonómica específica, ya que presentan menor grado de variabilidad (Zafra et al., 2014).

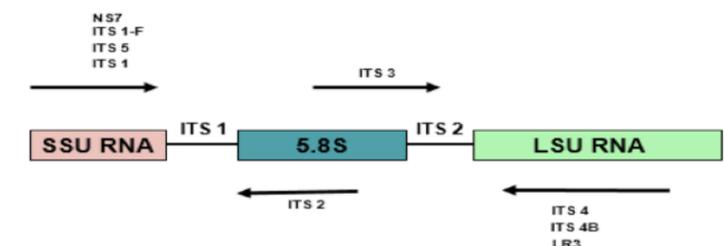


Figura. 1. Regiones ITS en el Gen Ribosomal de hongos y cebadores universales para la identificación

A partir de una muestra de suelo se hace la extracción de ADN total y por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se amplifican las secuencias 16S/18S con cebadores específicos, secuenciados y las secuencias son comparadas con bases de datos como GenBank NCBI para elaborar árboles filogenéticos que muestren el grado de parentesco genético entre varios microorganismos comparados (Fig. 2) (Rodicio y Mendoza, 2004).

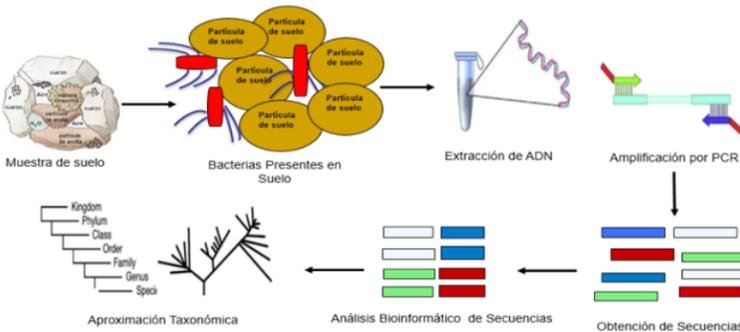


Figura. 2. Protocolo para identificación taxonómica de microorganismos por 16S/18S Ribosomal

En nuestro grupo de trabajo mediante estas técnicas se han identificado microorganismos aislados de suelos contaminados y seleccionados por su capacidad de tolerar y degradar PAHs, como algunas bacterias del género *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Kocuria* y *Delfia* y hongos del género *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* usando los cebadores ITS5 y ITS4B. (Reyes-César et. al, 2014; Zafra et. al, 2014).

2. SEGUIMIENTO DE POBLACIONES MICROBIANAS EN SUELOS CONTAMINADOS

Al trabajar con consorcios microbianos es importante conocer su influencia sobre las comunidades nativas, ya que generan cambios en la estructura de la comunidad, que pueden ser neutros, beneficiosos o incluso perjudiciales en el nuevo hábitat y lo cual depende de factores abióticos, como tipo de suelo, pH, disponibilidad de carbono, concentración de compuestos tóxicos, que tendrán un efecto diferencial sobre la diversidad de poblaciones del suelo en proceso de biorremediación. La microbiología tradicional no ha sido suficiente para el monitoreo de microorganismo en suelos, ya que con este tipo de técnicas solo se logra identificar cerca del 1% de los microorganismos. Sin embargo, los microorganismos no cultivables han demostrado tener un rol importante en los procesos de biorremediación (Desai, et. al, 2010).

2.1. Metagenómica.

La metagenómica es una herramienta molecular que permite obtener información sobre la diversidad microbiana en suelos contaminados y su dinámica durante el proceso de biorremediación, a través del análisis del DNA genómico total de una comunidad microbiana, sin necesidad de cultivarlos (Fig. 3). La metagenómica puede ser dirigida o

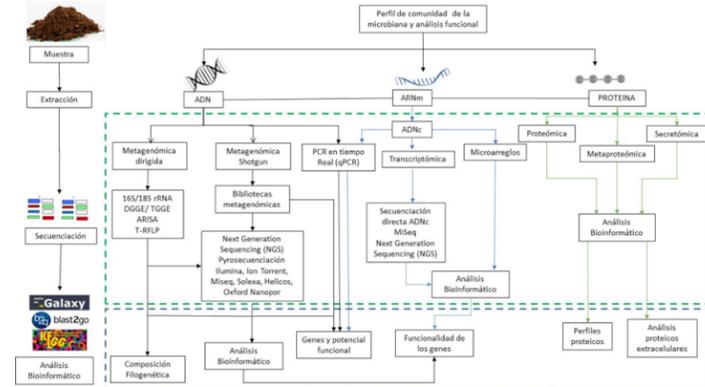


Figura. 3. Herramientas moleculares aplicadas para el análisis de poblaciones microbianas en procesos de biorremediación de suelos contaminados.

shotgun (Techtmann y Hazen, 2016).

En la metagenómica dirigida, se investiga la diversidad de un solo gen para identificar su compartimiento en el ambiente, la biodiversidad filogenética y la abundancia relativa en la muestra de suelo contaminado. Regularmente se realiza el análisis de la secuencia de la subunidad rRNA 16S/18S (bacterias y hongos, respectivamente). A partir de ADN total de una muestra de suelo, los genes amplificados por PCR, son secuenciados usando secuenciación masiva. Las secuencias son analizadas para poder realizar una comparación de los cambios en la diversidad microbiana antes y después de la contaminación.

En el análisis metagenómico shotgun, el DNA total extraído del suelo, es fragmentado para preparar bibliotecas de secuenciación, las cuales se secuencian para terminar el contenido genómico total de la muestra. Esta técnica es una herramienta importante para determinar el potencial funcional de la comunidad microbiana, vinculando un gen funcional con un grupo taxonómico y se pueden llegar a conocer los microorganismos dominantes en el proceso de biorremediación (Fig. 3). En nuestro grupo de trabajo hemos realizado análisis metagenómico taxonómico y funcional para analizar los efectos producidos entre la microbiota nativa y un consorcio microbiano mixto durante un proceso de biorremediación de un suelo contaminado con una mezcla de PAHs, donde el proceso de bioaugmentación/bioestimulación produjeron cambios en la diversidad microbiana. La metagenómica funcional mostró cambios en la abundancia de genes involucrados en la degradación de PAHs y las vías que favorecen la formación de

compuestos intermediarios tóxicos se redujeron significativamente (Zafra et. al, 2016).

2.2. Técnicas de código de barras genotípica de comunidades microbianas

Además de los enfoques basados en secuenciación para análisis de comunidades microbianas, se han desarrollado otras técnicas genotípicas conocidas como de código de barras de DNA basadas en PCR, como: electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)/con gradiente de temperatura (TGGE), análisis automatizado del espaciador intergénico ribosomal (ARISA), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP), entre otros. Las técnicas de DGGE/TGGE y ARISA están basadas en el análisis de los productos amplificados por PCR de las regiones del espaciador intergénico de los genes 16S y 18S rRNA o algún gen funcional, a partir de DNA extraído de una muestra de suelo. En el DGGE/TGGE, los fragmentos se separan en geles de poliacrilamida que tienen gradientes desnaturalizantes basados en químicos o temperatura (Chikere, 2013).

En ARISA, para hongos se utiliza, el espaciador interno transcrito (ITS1-5.8S-ITS2) y en bacterias, la región intergénica del rDNA localizada entre los genes 16S y 23S rRNA. La amplificación se realiza por PCR usando cebadores marcados con fluorescencia, los fragmentos son separados en un gel, el resultado es un patrón complejo de bandas que proporcionan un perfil específico de la comunidad (Desai et. al, 2010).

La técnica T-RFLP permite determinar cualitativamente la diversidad de especies presentes en una comunidad microbiana, los fragmentos de ADN amplificados por PCR con cebadores marcados con fluorescencia, son digeridos con enzimas de restricción y separados en un gel y visualizados por medio de la excitación del compuesto fluorescente, correlacionando la intensidad de la fluorescencia con la abundancia de las especies (Han et. al, 2017).

3. TÉCNICAS MOLECULARES PARA ANÁLISIS FUNCIONAL DE POBLACIONES MICROBIANAS EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS

La metatranscriptómica y metaproteómica se está aplicando cada vez más a los sistemas ambientales (Fig. 3). El estudio del RNA y la expresión de proteínas proporcionan información clave sobre las funciones metabólicas de una comunidad

microbiana durante un proceso de biorremediación en el momento del muestreo. Los análisis funcionales de comunidades microbianas se utilizan recientemente para predecir las vías de degradación.

3.1. Metatranscriptómica

Con esta técnica se estudian los perfiles de transcripción de mRNA. A partir de una muestra ambiental se extrae el mRNA y se sintetiza en cDNA, el cual es hibridado con microarreglos o secuenciado de manera similar a la metagenómica (fig. 3). Proporcionando un inventario de los niveles de expresión de genes activos en una muestra, permitiendo distinguir, los miembros activos y pasivos de una comunidad microbiana y sus vías metabólicas. La comparación de metatranscriptomes derivados de muestras sometidas a diferentes cultivos o condiciones ambientales puede proporcionar correlaciones entre la expresión génica y variables ambientales (Desai et. al, 2010).

3.2. Microarreglos

La técnica está basada en la hibridación de las moléculas de DNA blanco (de una sola célula o una comunidad microbiana) con la sonda en una matriz para medir el cambio en las señales de fluorescencia (la sonda o cDNA blanco se puede marcar con varios colorantes fluorescentes), si la secuencias de interés se encuentran en la muestra se producirá una fluorescencia (Singh y Nagaraj, 2006).

3.3 PCR en tiempo real (qPCR)

Esta técnica es una herramienta rápida, para la estimación de la dinámica de las comunidades microbianas o monitoreo de sus actividades catabólicas durante un proceso de biorremediación. Está basada en la detección de una molécula cuya fluorescencia aumenta a medida que el producto de PCR se acumula durante cada ciclo de amplificación. La fluorescencia se basa en sondas de hibridación (TaqMan) o utiliza colorantes (SYBR Green) (Cocci et. al, 2018).

3.4. Proteómica, secretómica y metaproteómica.

La proteómica se define como el conjunto total de proteínas presentes en una unidad biológica, en cualquier etapa de desarrollo y bajo condiciones específicas. La proteómica no implica la secuenciación de ácidos nucleicos, sino más bien el análisis global de las enzimas catabólicas implicadas en la biodegradación de una comunidad microbiana durante el proceso de biodegradación.

En el área de Biotecnología Ambiental, la proteómica, se usa para el análisis de proteínas totales de un microorganismo individual, mientras que la secretómica se basa en el estudio de las proteínas extracelulares de un organismo y que posiblemente están involucradas en las primeras etapas de oxidación de los PAHs y la metaproteómica es la más utilizada para determinar la funcionalidad de las comunidades microbianas en los procesos de biorremediación de suelos. La cual, ha tomado un interés particular debido a que se pueden caracteriza todas las proteínas expresadas en un tiempo determinado dentro de un ecosistema y juegan un papel clave en la exploración de la funcionalidad microbiana para discernir la contribución enzimática de cada uno de los microorganismos que forman el consorcio. Estos resultados junto con los análisis transcriptómicos permite el establecimiento de rutas de degradación en suelos contaminados (Siggins et. al, 2012).

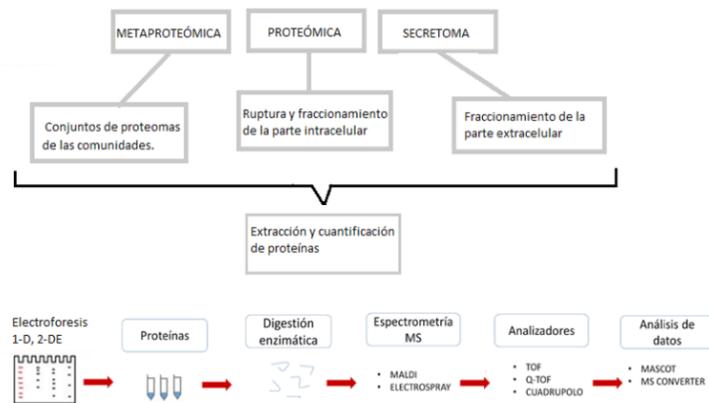


Figura 4. Esquema de la extracción y preparación de la muestra para un ensayo de metaproteómica, proteómica y secretoma.

Para llevar a cabo un análisis proteómico de uno o varios organismos (Fig. 4), se realiza una extracción y purificación de las proteínas. Posteriormente, las proteínas son sometidas a una digestión triptica para la obtención de péptidos; y por último se hace el uso de la espectrometría de masas, mediante el cual se ioniza la muestra y se separan los péptidos de acuerdo a su relación masa carga m/z .

4. INGENIERÍA GENÉTICA PARA EL MEJORAMIENTO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE PHAS

Para poder incrementar la capacidad de oxidación de los PAHs, la ingeniería genética toma relevancia en el área de Biotecnología Ambiental, ya que se pueden hacer modificaciones genéticas para aumentar la actividad enzimática por la sobreexpresión de genes que codifican para

una enzima específica en la degradación de PAHs (expresión homóloga), la inserción de genes que codifican para enzimas claves que participan en los procesos de biodegradación de un microorganismo en otro que tenga capacidad de crecer en sitios contaminados (expresión heteróloga) o dirigir las rutas de degradación para poder mineralizar los PAHs de manera eficiente sin formar intermediarios más tóxicos por el silenciamiento de genes que codifican para producción de enzimas no deseadas, generando microorganismos modificados genéticamente que son más eficientes (Fig. 5).

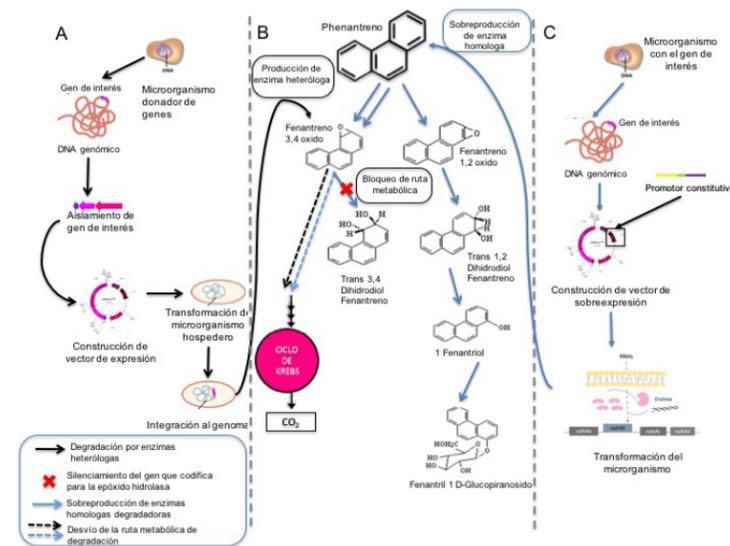


Figura 5. Aplicación de la ingeniería genética para el mejoramiento de microorganismos degradadores de compuestos xenobióticos. A. Expresión heteróloga (Inserción de genes que codifican para la producción de enzimas de interés en un organismo que no expresa este tipo de genes para ahora producir enzimas heterólogas) B. Ingeniería metabólica (Silenciamiento de genes que codifican para enzimas para desvío de rutas de degradación para evitar la formación de productos indeseados) C. Expresión homóloga (sobreexpresión de un gen que codifica para la producción de enzimas degradadoras para incrementar su producción y mejorar el proceso de degradación)

Existen reportes de la expresión homóloga de versátil peroxidasa MnP2 en *Pleurotus ostreatus* para incrementar su capacidad de degradación de PAHs, demostrando una mayor capacidad de degradación (Tsukihara et. al, 2006). En nuestro grupo de trabajo hemos obtenido cepas transformantes de hongos filamentosos *A. niger* y *T. spectabilis*, que producen enzimas heterólogas como manganeso, lignina y versátil peroxidasa. (Cortés-Espinosa et al., 2012).

CONCLUSIONES

Como se expuso en este artículo, las técnicas moleculares se han convertido en una herramienta muy importante en la Biotecnología Ambiental, ya que han permitido profundizar en el estudio de procesos de biorremediación de suelos contaminados con PAHs, conociendo más a detalle los procesos metabólicos, las enzimas involucradas en las rutas

metabólicas de degradación. Las técnicas moleculares metaómicas nos permiten conocer la dinámica y diversidad de poblaciones microbianas hasta el análisis funcional para discernir los cambios a nivel genético de los microorganismos por las condiciones adversas de contaminación. El perfil de la dinámica de la comunidad microbiana durante el proceso de biorremediación ha permitido identificar cepas microbianas o genes claves que son cruciales para un exitoso proceso de biorremediación *in situ* o *ex situ*.

Agradecimientos: Al Instituto Politécnico Nacional por proyecto SIP20180442. Conacyt por apoyo de becas (No. Becarios: 598787, 588791, 486354,613287)

REFERENCIAS

- Abdel-Shafy, H. I. y Mansour, M. S. M. (2016) "A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation", Egyptian Journal of Petroleum. Egyptian Petroleum Research Institute, 25(1), pp. 107-123.
- Chikere, C. B. (2013) "Application of Molecular Microbiology Techniques in Bioremediation of Hydrocarbons and Other Pollutants", British Biotechnology Journal, 3(1), pp. 90-115.
- Cocci, P. et al. (2018) "Investigating the potential impact of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on gene biomarker expression and global DNA methylation in loggerhead sea turtles (Caretta caretta) from the Adriatic Sea", Science of the Total Environment, 619-620, pp. 49-57.
- Cortés-Espinosa, D. V et al. (2012) "Heterologous expression of manganese peroxidase in *Aspergillus niger* and its effect on phenanthrene removal from soil". J Mol Microbiol Biotechnol 2011;21:120-129.
- Desai, C., Pathak, H. y Madamwar, D. (2010) "Advances in molecular and 'omics' technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites", Bioresource Technology. Elsevier Ltd, 101(6), pp. 1558-1569.
- Han, X. et al. (2017) "Effects of different agricultural wastes on the dissipation of PAHs and the PAH-degrading genes in a PAH-contaminated

soil", Chemosphere. Elsevier Ltd, 172, pp. 286-293.

Keith, L. H. (2015) "The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants", Polycyclic Aromatic Compounds, 35(2-4), pp. 147-160.

Kuppusamy, S. et al. (2017) "Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions", Chemosphere. Elsevier Ltd, 168, pp. 944-968.

Reyes-César, A. et al. (2014) "Biodegradation of a mixture of PAHs by non-ligninolytic fungal strains isolated from crude oil-contaminated soil".

Rodicio, M. D. R. y Mendoza, M. D. C. (2004) "Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica", Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, pp. 238-245.

Siggins, A., Gunnigle, E. y Abram, F. (2012) "Exploring mixed microbial community functioning: Recent advances in metaproteomics", FEMS Microbiology Ecology, pp. 265-280.

Singh, O. V. y Nagaraj, N. S. (2006) "Transcriptomics, proteomics and interactomics: Unique approaches to track the insights of bioremediation", Briefings in Functional Genomics and Proteomics, 4(4), pp. 355-362.

Techtmann, S. M. y Hazen, T. C. (2016) "Metagenomic applications in environmental monitoring and bioremediation", Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. Springer Berlin Heidelberg, 43(10), pp. 1345-1354.

Tsukihara, T. et al. (2006) "Molecular breeding of white rot fungus *Pleurotus ostreatus* by homologous expression of its versatile peroxidase MnP2", Applied Microbiology and Biotechnology, 71(1), pp. 114-120.

Zafra, G. et al. (2014) "Isolation and Selection of a Highly Tolerant Microbial Consortium with Potential for PAH Biodegradation from Heavy Crude Oil-Contaminated Soils".

Zafra, G. et al. (2016) "Comparative metagenomic analysis of PAH degradation in soil by a mixed microbial consortium", Journal of Hazardous Materials, 318, pp. 702-710.

Zafra, G. et al. (2017) "Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil", Chemosphere, 172, pp. 120-126.

ESTUDIO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE REDUCTASAS DE VEGETAL

Aida Solís Oba*, Rosa María Martínez, Fadia Domínguez, Herminia I. Pérez, Norberto Manjarrez.
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, C.P. 04960, CDMX.
email:asolis@correo.xoc.uam.mx

RESUMEN

Se evaluó la actividad reductasa de diferentes materiales vegetales para llevar a cabo la reducción de benzaldehído a alcohol bencílico, el material vegetal más activo fue la semilla de avena con un 51% de reducción, con las semillas de calabaza, trigo, pimienta, chile y ejote la reducción fue del 17 al 41%, mientras que con apio, nopal, pepino, papa, aguacate y brócoli fue del 14 al 33%. Estas fuentes crudas de reductasa pueden ser empleadas como agentes reductores de otros aldehídos o cetonas para la preparación de alcoholes, con la ventaja de no requerir de procesos costosos de aislamiento para tener la enzima pura, ni la generación de residuos contaminantes al utilizar agentes reductores químicos.

Palabras clave: reductasa, alcohol bencílico, aldehído, alcohol

ABSTRACT

The reductase activity of different vegetal materials was evaluated to carry out the reduction of benzaldehyde to benzyl alcohol, the most active vegetal material was the oat seed with a 51% reduction, with the seeds of pumpkin, wheat, pepper, chili and ejote the reduction was from 17 to 41%, while celery, nopal, cucumber, potato, avocado and broccoli was from 14 to 33%. These crude reductase sources can be used to reduce other aldehydes and ketones for the preparation of alcohols, with the advantage of not requiring expensive isolation processes to have the pure enzyme, nor the generation of polluting residues when using chemical compounds as reducing agents.

Key words: reductase, benzyl alcohol, aldehyde, alcohol.

INTRODUCCIÓN

El uso de biocatalizadores para la preparación de compuestos orgánicos presenta importantes ventajas que los hacen ambientalmente amigables y atractivos para su uso en síntesis orgánica, como son el empleo de soluciones acuosas en lugar de disolventes orgánicos, reacciones a temperatura ambiente y pH neutro, pero lo más relevante es su alta especificidad (Panke et al., 2004; Pollard and Woodley, 2006).

La obtención de compuestos orgánicos usando biocatalizadores cumplen varios de los puntos que se consideran dentro de la química verde, como son: es mejor prevenir la generación de desechos que tratarlos o limpiarlos después de que se han generado, durante la biocatálisis se minimiza la formación de productos secundarios; cuando sea aplicable, los métodos sintéticos deben usar y generar sustancias que sean poco o no tóxicos al humano y al ambiente, los procesos biocatalíticos se llevan a cabo en medio acuoso y los biocatalizadores son sustancias biológicas que se degradan sin generar productos tóxicos; los requerimientos energéticos son mínimos puestos que se llevan a cabo a temperatura ambiente; así mismo debido a que los biocatalizadores son selectivos se obtienen mejores resultados que cuando se tienen reacciones equimolares (Anastas and Warner, 1998).

Los alcoholes aromáticos son materias primas de gran importancia para la industria química, farmacéutica, agrícola, de alimentos y de fragancias. Los alcoholes aromáticos se pueden obtener químicamente por reducción de compuestos carbonílicos, usando catalizadores químicos, el principal problema es la generación de residuos que pueden ser tóxicos y difíciles de disponer. Una alternativa que ha ganado relevancia tanto en la academia como en la industria es el uso de deshidrogenasas dependientes de nicotinamida, enzimas capaces de llevar a cabo la reducción de grupos carbonilo como aldehídos y cetonas a los correspondientes alcoholes. En la industria de los sabores y las fragancias, los biocatalizadores juegan un papel importante en la síntesis de intermediarios (Hollmann et al., 2011). Por ejemplo, el alcohol bencílico es un alcohol aromático que se usa como conservador, disolvente y anestésico local, se ha usado para la preparación de una gran variedad de productos, como reveladores fotográficos, en textiles, bacteriostáticos, cosméticos, preparación de fragancias, etc. (BeScience; FDA; Scognamiglio et al., 2012)

Las deshidrogenasas o reductasas son biocatalizadores se pueden obtener principalmente de microorganismos, pero las plantas son una alternativa accesible y económica como fuente de dichas enzimas (Cordell et al., 2007). En

un contexto verde, se puede tener en cuenta la posibilidad de utilizar partes de plantas como fuentes biocatalizadores para reducir aldehídos y cetonas como una alternativa para la síntesis de alcoholes (Rowan et al., 2013).

Este trabajo se ha centrado en el estudio de nuevas fuentes de biocatalizadores en materiales de origen vegetal como verduras, semillas y hojas, entre otros, para la reducción de benzaldehído a alcohol bencílico. Una de las principales ventajas del uso de materiales vegetales como fuentes de biocatalizadores son sus bajos costos, fácil accesibilidad, obtención de cantidades grandes de biomasa, así mismo este material vegetal es biodegradable por lo que no se generan contaminantes del ambiente.

METODOLOGÍA

Preparación de la fuente de biocatalizador

Los materiales vegetales se adquirieron en mercados locales. El material vegetal se lava con agua y detergente, luego se sumerge durante 10 min en una solución de hipoclorito de sodio al 5 %, se enjuaga con agua destilada y se deja secar. Posteriormente se muele en una licuadora con agua destilada (1 g con 1 mL). La mezcla se centrifuga a 5000 rpm por 20 min, el sobrenadante se usa como fuente de enzima.

Las semillas se desinfectan como se señaló antes, posteriormente se muelen en un molino de café para tener un polvo fino, 1 g de polvo se suspende en 4 mL de agua y se agita 1 hora, la mezcla se centrifuga y se utiliza el sobrenadante como fuente de enzima.

Método general para la reducción biocatalizada

Al extracto acuoso correspondiente (1 mL) se le agregan 1.484×10^{-5} moles de benzaldehído, la mezcla se agita a 1300 rpm, 25 °C, durante 24 h. Posteriormente la mezcla de reacción se extrae con éter etílico, se separa la fase orgánica, se seca con sulfato de sodio anhidro y se analiza por cromatografía de gases (CG), para determinar el % de conversión, utilizando el área bajo la curva del benzaldehído y del alcohol bencílico, los experimentos se realizaron por triplicado.

RESULTADOS

Se estudiaron 12 materiales biológicos de origen vegetal con el propósito de detectar actividad reductasa en ellos, con la finalidad de usarlos como posibles catalizadores para la reducción de aldehídos a los correspondientes alcoholes.

Tabla I. Reducción de benzaldehído a alcohol bencílico usando reductasas de origen vegetal

Material vegetal	Nombre científico	% conv**
Semilla de avena	<i>Avena sativa</i>	51
Vaina de ejote	<i>Phaseolus vulgaris</i>	41
Semilla de calabaza	<i>Cucurbita maxima</i>	29
Semilla de trigo	<i>Triticum aestivum</i>	28
Semilla de pimiento	<i>Capsicum annum</i>	23
Semilla de chile	<i>Capsicum frutescens</i>	17
Tallo de apio	<i>Apium graveolens</i>	33
Penca de nopal	<i>Opuntia ssp.</i>	19
Fruto de pepino	<i>Cucumis sativus</i>	18
Tuberculo de papa	<i>Solanum tuberosum</i>	15
Fruto de aguacate	<i>Persea Americana</i>	14
Inflorescencia de brócoli	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	19

% conv**: % de conversión determinado por CG

En la Tabla I se muestran los resultados obtenidos de la reducción de benzaldehído a alcohol bencílico, donde se puede observar que todos los materiales presentan actividad reductasa. La mayor conversión se obtuvo con la semilla de avena, la cual transforma benzaldehído en un 51%, seguida de ejote con 41%, en 24 h; con el resto de los materiales la conversión se encuentra entre 14 y 33%. Cabe resaltar que en este trabajo preliminar las reacciones se llevaron a cabo en condiciones no optimizadas y en medio acuoso, el estudio es para detectar material vegetal con actividad reductasa, el siguiente estudio sería determinar la influencia del pH del medio de reacción, temperatura, tiempo, relación de cantidad de material vegetal con respecto al sustrato, así como la influencia de codisolvente.

Entre otros materiales vegetales que se han estudiado para reducir benzaldehído a alcohol bencílico se encuentran hojas de *Musa sapientum* (0%) y *Zea mays* (90%) (Luna et al., 2014), *M. esculenta* (91%), *M. dulcis* (83%) (Machado et al., 2006), *Euphorbia portulacoides* L. var. *portulacoides* (0%), *Talinum polygaloides* Gillies ex Arn. (98% en 6 días), *Puya spathacea* (98% en 5 días) y *Daucus carota* L. (99% en 3 días) (Salvano et al., 2011)

CONCLUSIONES

Se detectaron doce materiales vegetales con actividad reductasa, que llevaron a cabo la reducción de benzaldehído a alcohol bencílico, estos materiales se pueden utilizar como potenciales agentes reductores de otros compuestos con grupos carbonilo para la preparación de alcoholes.

REFERENCIAS

Anastas, P. T. and Warner, J. C. 1998. Green Chemistry: Theory and Practice. Oxford University Press: New York.

BeScience. Alcohol Bencílico, NF. <https://www.bescience.com/products/alcohol-bencilico-nf>. Revisado 10/04/2018.

Cordell, G.A., Lemos, T.L.G., Monte, F.J.Q. and de Mattos, M.C. 2007. Vegetables as Chemical Reagents. J. Nat. Prod. 70: 478-492

FDA. Draft Guidance on Benzyl Alcohol. <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM428198.pdf>. Revisado 10/04/2018.

Hollmann, F., Arends, I.W. and Holtmann, D. 2011. Enzymatic reductions for the chemist. Green Chem. 13: 2285-2314.

Luna, H., Hernández-Vázquez, L., Reyó, A., Arias, L. y Manjarrez, N. 2014. Banana and maize leaf wastes as a green alternative for the preparation of benzyl alcohols used as starting materials for fragrances. Ind. Crops Prod. 59: 105-108.

Machado, L.L., Souza, J., Mattos, M.C, Sakata, S., Cordell, G.A., Lemos, T. 2006. Bioreduction of aldehydes and ketones using Manihot species. Phytochem. 67: 1637-1643

Panke, S., Held, M. and Wubbolts, M. 2004. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. Cur. Opin. Biotechnol. 15:272-279. Pollard, David and Woodley, J.M. 2006. Biocatalysis for pharmaceutical

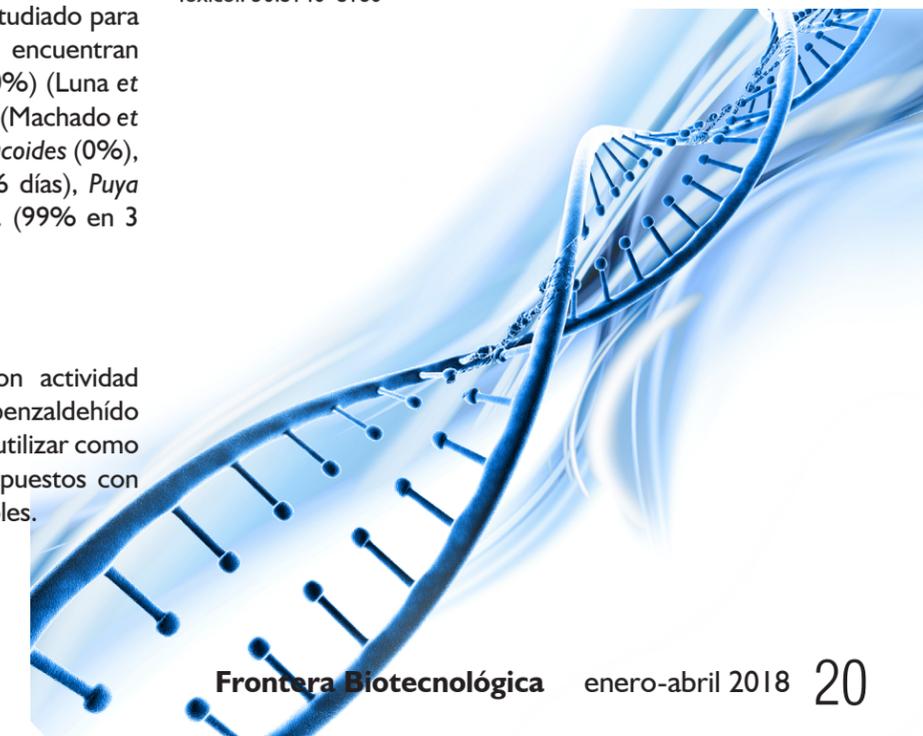
intermediates: the future is now. TRENDS Biotechnol. 25(2): 66-73.

Rowan, A.S., Moody, T.S., Howard, R.M., Underwood, T.J., Miskelly, I.R., He, Y. and Wang, B. 2013. Preparative access to medicinal chemistry related chiral alcohols

using carbonyl reductase technology. Tetrahedron: Asymm. 24: 1369-1381.

Salvano, M.S., Cantero, J.J., Vázquez, A.M., Formica, S.M. and Aimar, M.L. 2011. Searching for local biocatalysts: Bioreduction of aldehydes using plant roots of the Province of Córdoba (Argentina). J. Mol. Catal. B: Enzym. 71: 16-21.

Scognamiglio, J., Jones, L., Vitale, D., Letizia, C.S. and Api A.M. 2012. Review. Fragrance material review on benzyl alcohol. Food Chem. Toxicol. 50:S140-S160



ESPECTROSCOPIA DIELECTRICA COMO HERRAMIENTA PARA EL MONITOREO DE BIOPROCESOS

Adrián Díaz Pacheco¹, Víctor Eric López y López^{1*}

¹Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional (CIBA-IPN, Tlaxcala), Carretera Estatal Sta. Inés Tecuexcomac – Tepetitla km 1.5, Tlaxcala, México.

*E mail: vlopezyl@ipn.mx

RESUMEN

El cultivo de células en reactores es una de las etapas más importantes del bioproceso; durante esta se define la cantidad y calidad del producto de interés. Es por ello que gran número de trabajos se han enfocado en el empleo de diferentes herramientas y técnicas que permitan lograr un monitoreo y control más específico y detallado con la finalidad de mejorar la comprensión de los procesos. Una de estas técnicas es la espectroscopia dieléctrica, la cual debido a sus características permite diferenciar entre células vivas y muertas, proporcionando información en tiempo real del estado celular de manera no invasiva ni destructiva. Debido a esto, la espectroscopia dieléctrica se perfila como una Tecnología Analítica de Proceso (PAT) para su empleo en procesos industriales. En la presente revisión se abordarán los fundamentos de la técnica y algunas aplicaciones de interés en bioprocesos.

Palabras clave

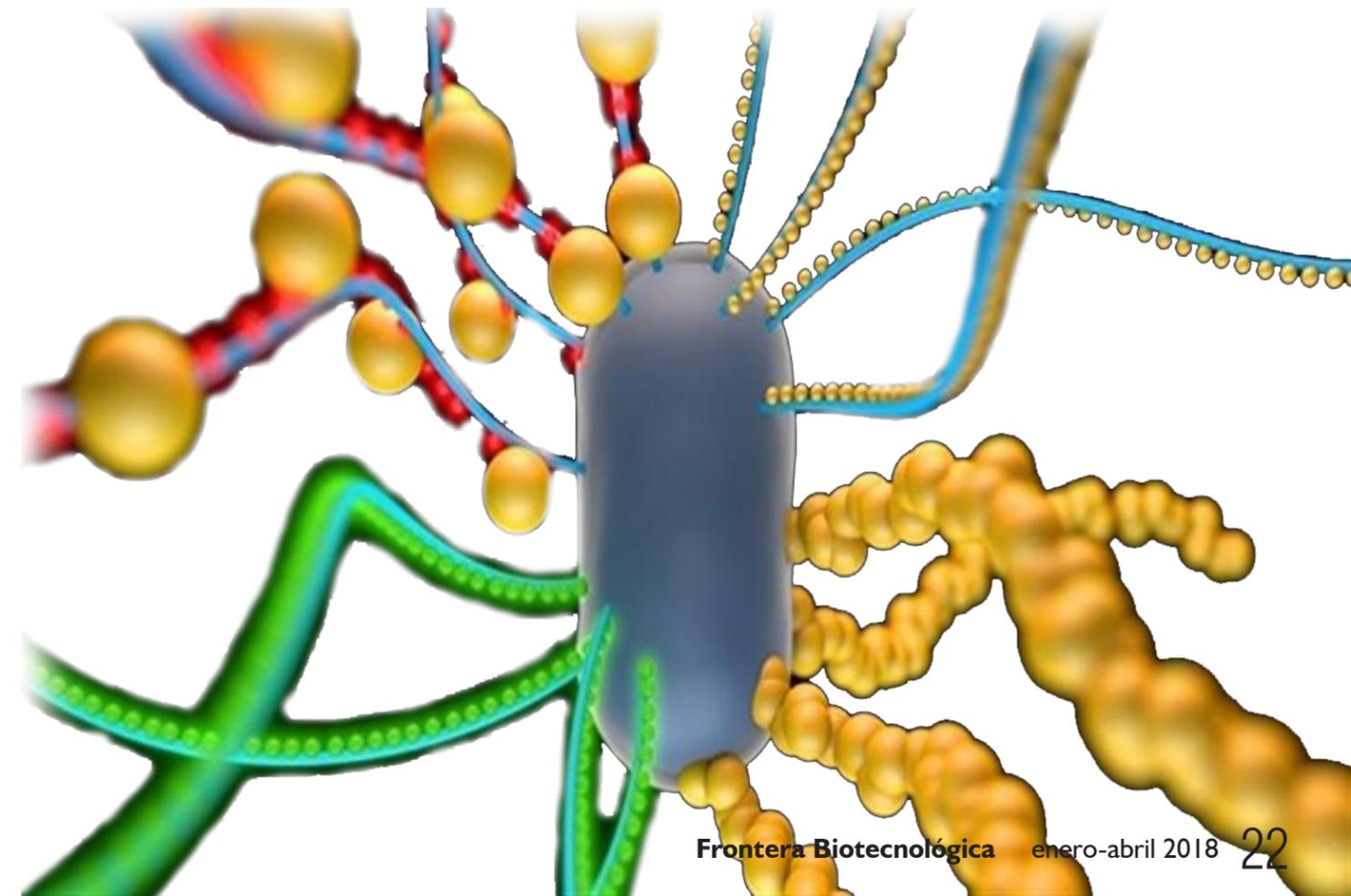
Espectroscopia dieléctrica, monitoreo, bioprocesos

ABSTRACT

The cell culture in reactors is one of the most important stages of the bioprocess. During this phase the quantity and quality of the product of interest is defined. This is the reason why many investigations have been focused on the use of different tools and techniques to achieve more specific and detailed monitoring and control, in order to improve the understanding of the processes. One of these techniques is dielectric spectroscopy, which due to its characteristics allows to differentiate between living and dead cells, providing information in real time of the cellular state in a non-invasive or destructive way. Because of this, dielectric spectroscopy is emerging as an Analytical Process Technology (PAT) for its use in industrial processes. In the present review, the fundamentals of the technique and some applications of interest in bioprocesses will be addressed.

Key words

Dielectric spectroscopy, monitoring, bioprocess



1. INTRODUCCIÓN

El monitoreo y control de procesos es una herramienta indispensable para el desarrollo y optimización de los mismos (Ansorge, et al, 2009). Su empleo permite la generación de productos de mayor calidad mediante la determinación, comprensión y control de los parámetros clave que afectan la producción (Pohlscheidt, et al, 2013). Actualmente, los parámetros más empleados en el cultivo celular y cuyo monitoreo y control es fundamental son: la temperatura, velocidad de agitación, formación de espuma, potenciales redox, pH y concentraciones de oxígeno disuelto y dióxido de carbono (Mulchandani y Bassi, 1995). Sin embargo, estos parámetros simplemente son empleados para mantener las condiciones de operación del proceso, sin que esto repercuta en una alta productividad del mismo (Czermak, et al, 2009). A pesar de la importancia de estos parámetros, el monitoreo de la biomasa a través de alguna de sus propiedades como la morfología, la concentración, la viabilidad o la actividad celular, puede proveer información de mayor relevancia como el estado del proceso (Riley, 2006). Debido a esto, la biomasa es considerada una de las variables cuyo monitoreo es primordial, la medición confiable de esta ha sido la meta por décadas y es por ello que gran variedad de métodos y sistemas han sido desarrollados para su monitoreo *in situ* (Kiviharju, et al, 2008). Sin embargo, debido a que los métodos actuales como: la densidad óptica, la calorimetría, la microscopia *in situ*, la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear, la Velocidad de Consumo de Oxígeno y el Coeficiente Respiratorio, se basan en la determinación de al menos una de las propiedades de la biomasa (Biechele, et al, 2015; Bluma, et al, 2010; Beutel y Henkel, 2011), no pueden interrelacionarse entre si o aplicarse a todo tipo de procesos o cultivos, ya que difieren en los principios de medición o en la variable de interés correlacionada (Kiviharju, et al, 2007). Es por ello que se requiere el empleo de técnicas que permitan lograr un monitoreo *in situ* de biomasa en tiempo real y con posibilidad de aplicarse a todo tipo de procesos, esto con la finalidad de realizar un monitoreo de proceso más detallado, que cumpla con los requerimientos de Buenas Practicas de Fabricación (GMP por sus siglas en inglés) y con las iniciativas como la Tecnología Analítica de Proceso (PAT, por sus siglas en inglés), ambos propuestos por organismos regulatorios como la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) y la Agencia Europea de Medicamentos (AEM), para la validación de procesos (FDA, 2004; Clementschitsch y Bayer, 2006; Glassey, et al, 2011; Pohlscheidt, et al, 2013). Una técnica que ha resultado útil para el monitoreo *in situ* y en tiempo real de cultivos celulares es la espectroscopia dieléctrica, debido a que permite el monitoreo de células vivas en suspensión e inmobilizadas de manera no invasiva, ni destructiva (Carvell y Dowd, 2006).

2. ESPECTROSCOPIA

DIELÉCTRICA

La espectroscopia dieléctrica (ED) como técnica aplicada en sistemas biológicos tiene sus orígenes a principios del siglo XX, con los experimentos dieléctricos del médico Alemán Höber, los cuales tenían por objetivo investigar las propiedades dieléctricas de los eritrocitos a diferentes frecuencias (Höber, 1912; Pethig y Kell, 1987). A partir de su trabajo, surgieron muchos otros enfocados en la obtención de las propiedades dieléctricas de distintas células a través de modelos que permitieran explicar los espectros dieléctricos obtenidos, asentando de esta manera las bases de la ED (Sanchis, 2009).

2.1 Fundamento de la Espectroscopia Dieléctrica

Esta técnica se basa en la medición de las propiedades dieléctricas de una suspensión celular mediante la aplicación de un campo eléctrico de corriente alterna, el cual ocasionará el movimiento de los iones presentes en el medio intra y extra celular en dirección a los respectivos electrodos (Figura 1A) (Yardley, et al, 2000; Impe y E, 2002). Tal movimiento se verá restringido por las membranas celulares de naturaleza no conductora, resultando en la polarización de las mismas y ocasionando que cada célula actúe como un capacitor eléctrico (Figura 1B) (Horta, et al, 2015), el cual ocasionará un desfase entre la onda de corriente y la onda de voltaje, que puede ser medido, resultando en una lectura directa de la Impedancia de la suspensión celular (Senner, 1994; K'Owino y Sadik, 2005).

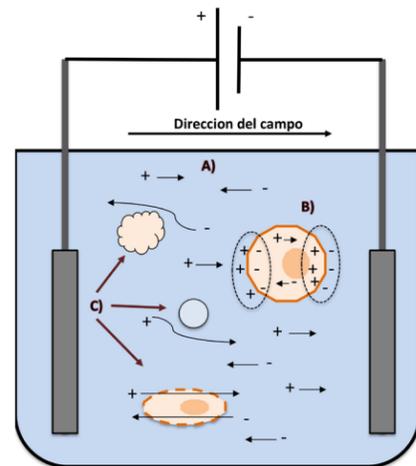


Figura 1. Efecto de la aplicación de un campo eléctrico de corriente alterna a una suspensión celular. A) Migración de iones presentes en el medio en dirección a sus respectivos electrodos. B) Polarización de las membranas celulares debido a la migración de iones intracelulares y extracelulares. C) Los sólidos en suspensión, las burbujas y las células muertas no presentan polarización, por lo cual sus propiedades dieléctricas son insignificantes en comparación con las células viables.

El grado de polarización de la membrana celular está en función de la frecuencia empleada y es independiente de la concentración celular, pero dependiente del tamaño de la célula (Figura 2) (Cannizzaro, et al, 2003; Opel, et al, 2010). A altas frecuencias la membrana se encuentra mínimamente polarizada, representando una resistencia mínima para el paso de la corriente, mientras que a bajas frecuencias la membrana se encuentra completamente polarizada (Figura 3), por lo que actúa como una resistencia (Reactancia capacitiva) que puede ser medida (Kim, et al, 2009; Tibayrenc, et al, 2011). Para la mayoría de las células, el intervalo de frecuencias bajo las cuales pueden actuar como capacitores se encuentra en una región llamada β -dispersión y comprende las frecuencias de 1 kHz a 10 MHz, siendo también el intervalo adecuado para la medición de la densidad celular viable (Schwan, 1957; Asami, 2002; Carvell y Dowd, 2006). Debido a que únicamente las células con membranas intactas se comportan como un capacitor en estas frecuencias, todos los demás elementos como las células muertas o las burbujas presentan valores de propiedades insignificantes en comparación a las células vivas, permitiendo únicamente el monitoreo de células viables (Figura 1C) (Fehrenbach, et al, 1992; Olguín-Sánchez, et al, 2009).

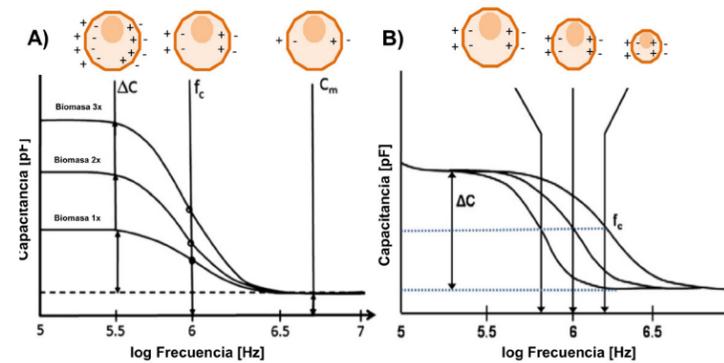


Figura 2. Espectros dieléctricos de capacitancia de una suspensión celular. Efecto de la concentración celular (A) y del diámetro celular (B) sobre los espectros dieléctricos (Adaptado de Cannizzaro, et al, 2003).

2.2 Aplicaciones en el monitoreo de bioprocesos

Numerosas aplicaciones se han desarrollado enfocadas en los campos de caracterización, análisis y monitoreo celular (Figura 4), tales aplicaciones van desde el desarrollo de sistemas de medición que permitan obtener las propiedades dieléctricas de una sola célula, hasta aplicaciones en el diagnóstico de enfermedades. Sin embargo, una de las aplicaciones con más diversificación es la enfocada al monitoreo celular (Heileman, et al, 2013). Esto debido principalmente a su implicación en el monitoreo de los bioprocesos industriales.

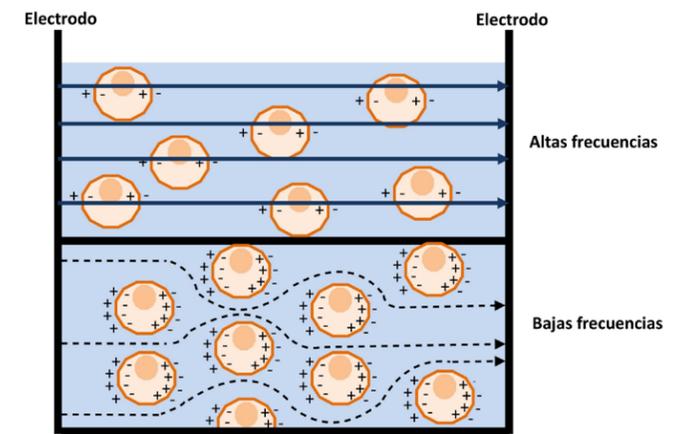


Figura 3. Diagrama del campo eléctrico aplicado entre dos electrodos a altas y bajas frecuencias. A altas frecuencias, las células se encuentran mínimamente polarizadas, por lo cual no representan una resistencia al paso de la corriente. A bajas frecuencias, las células se encuentran altamente polarizadas, por lo cual representan una resistencia al paso de la corriente que puede ser medida.

Actualmente la ED se ha empleado en el monitoreo de varios tipos de cultivos celulares. Algunos ejemplos destacables de su aplicación en cultivos de bacterias, hongos, células vegetales, células de insecto y células animales, se mencionan a continuación. En el cultivo de bacterias como *Bacillus* la

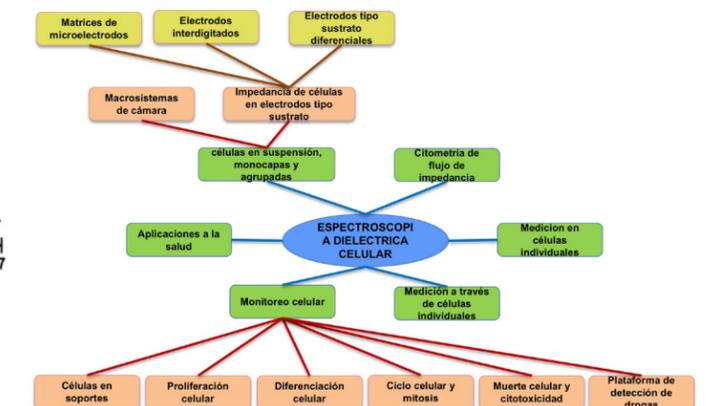


Figura 4. Aplicaciones de la espectroscopia dieléctrica asociadas a los campos de caracterización, análisis y monitoreo celular (Adaptado de Heileman, et al, 2013).

técnica ha permitido detectar en tiempo real los cambios fisiológicos ocurridos durante las fases de crecimiento (Sarrfzadeh, et al, 2005; Dinorín-Téllez-Girón, et al, 2015), siendo un paso importante para la caracterización de los procesos. En cultivos de hongos como las levaduras, la ED ha servido para estimar la concentración celular durante el proceso de fermentación (Harris, et al, 1987; Mishima, et al, 1991), siendo esta la meta de muchas otras técnicas de monitoreo. En el cultivo de células vegetales la técnica dieléctrica ha sido empleada en el monitoreo de los efectos de las condiciones de cultivo sobre las células, como la

sensibilidad a las fuerzas de corte debidas a la agitación (Markx, et al, 1991), permitiendo una rápida evaluación y replanteamiento de las condiciones de cultivo. En el cultivo de células de insecto la ED se ha empleado para la caracterización de algunos procesos como la producción de Vectores Adeno-Asociados, permitiendo la determinación del tiempo óptimo de cosecha, el cual es uno de los parámetros esenciales para el escalamiento de estos procesos (Negrete, et al, 2007). Y finalmente en el cultivo de células animales la técnica ha permitido obtener información de diversos procesos como el monitoreo en tiempo real de la diferenciación de células madre, el cual es crítico para el escalamiento de estas tecnologías (Bagnaninchi y Drummond, 2011). Otros procesos en que la técnica dieléctrica ha contribuido es en el monitoreo de biomasa en cultivos con células animales inmovilizadas, el cual es sumamente complicado empleando otras técnicas debido a que las células no se encuentran accesibles para su análisis, requiriendo primero el desprendimiento de estas de los sistemas de inmovilización (Noll y Biselli, 1998; Cole, et al, 2015). Una de las aplicaciones más destacables y recientes de la ED es en la producción de virus como el sarampión en cultivos de células cancerosas, ya que permitió la caracterización de las cinéticas de infección y la optimización de los tiempos de infección y cosecha (Grein, et al, 2017), parámetros necesarios para la producción de virus a mayor escala como tratamiento para el cáncer. Por estas y muchas otras aplicaciones la ED es considerada una herramienta prometedora para el monitoreo de bioprocesos, perfilándose como una PAT para su empleo en el monitoreo de procesos farmacéuticos y alimentarios a gran escala (Justice, et al, 2011; Teixeira, et al, 2009). Finalmente, en la Figura 5 se muestra un ejemplo de sistema empleado en el monitoreo dieléctrico de fermentaciones de *Bacillus*.



Figura 5. Ejemplo de sistema empleado para el monitoreo del cultivo por lote de *Bacillus* mediante espectroscopia dieléctrica.

3. CONCLUSIONES

Debido a que las propiedades dieléctricas de la membrana celular funcionan como indicador de viabilidad, la espectroscopia

dieléctrica resulta una herramienta útil para el monitoreo de forma continua del estado y la concentración celular. Su empleo en cultivos celulares ha permitido obtener mayor información e incluso ha posibilitado la optimización de algunos procesos. Sin embargo, aún es necesaria la caracterización de muchos otros procesos mediante el empleo de esta técnica, por lo cual es preciso continuar con la investigación y aplicación de la técnica a diferentes tipos de procesos.

REFERENCIAS

- Ansorge, S., Esteban, G., and Schmid, G. 2009. Multifrequency permittivity measurements enable on-line monitoring of changes in intracellular conductivity due to nutrient limitations during batch cultivations of CHO cells. *Biotechnology Progress*. 26(1): 272-283. <http://doi.org/10.1002/btpr.347>
- Asami, K. 2002. Characterization of biological cells by dielectric spectroscopy. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 305: 268-277.
- Bagnaninchi, P. O., and Drummond, N. 2011. Real-time label-free monitoring of adipose-derived stem cell differentiation with electric cell-substrate impedance sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(16): 6462-6467. <http://doi.org/10.1073/pnas.1018260108>
- Beutel, S., and Henkel, S. 2011. In situ sensor techniques in modern bioprocess monitoring. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91(6): 1493-1505. <http://doi.org/10.1007/s00253-011-3470-5>
- Biechele, P., Busse, C., Solle, D., Scheper, T., and Reardon, K. 2015. Sensor systems for bioprocess monitoring. *Engineering in Life Sciences*. 15(5): 469-488. <http://doi.org/10.1002/elsc.201500014>
- Bluma, A., Höpfner, T., Lindner, P., Rehbock, C., Beutel, S., Riechers, D., Scheper, T. 2010. In-situ imaging sensors for bioprocess monitoring: state of the art. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 398(6): 2429-2438. <http://doi.org/10.1007/s00216-010-4181-y>
- Cannizzaro, C., Güerli, R., Marison, I., and von Stockar, U. 2003. On-line biomass monitoring of CHO perfusion culture with scanning dielectric spectroscopy. *Biotechnology and Bioengineering*. 84(5): 597-610. <http://doi.org/10.1002/bit.10809>
- Carvell, J. P., and Dowd, J. E. 2006. On-line Measurements and Control of Viable Cell Density in Cell Culture Manufacturing Processes using Radio-frequency Impedance. *Cytotechnology*. 50(1-3): 35-48. <http://doi.org/10.1007/s10616-005-3974-x>
- Clements, F., and Bayer, K. 2006. Improvement of bioprocess monitoring: development of novel concepts. *Microbial Cell Factories*. 5(1): 19. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-5-19>
- Cole, H., Demont, A., and Marison, I. 2015. The Application of Dielectric Spectroscopy and Biocalorimetry for the Monitoring of Biomass in Immobilized Mammalian Cell Cultures. *Processes*. 3(2): 384-405. <http://doi.org/10.3390/pr3020384>
- Czermak, P., Pörtner, R., and Brix, A. 2009. Special Engineering Aspects. In *Cell and Tissue Reaction Engineering*. Edited by R. Eibl, D. Eibl, R. Pörtner, G. Catapano, and P. Czermak. Springer Berlin Heidelberg. pp. 83-172. http://doi.org/10.1007/978-3-540-68182-3_4
- Dinorín-Téllez-Girón, J., Delgado Macuil, R. J., Larralde Corona, C. P., Martínez Montes, F. J., de la Torre Martínez, M., and López-Y-López, V. E. 2015. Reactance and resistance: main properties to follow the cell differentiation process in *Bacillus thuringiensis* by dielectric spectroscopy in real time. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99(13): 5439-5450. <http://doi.org/10.1007/s00253-015-6562-9>

- FDA. 2004. Guidance for Industry PAT: A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. FDA Official Document, (September), 16. <http://doi.org/http://www.fda.gov/CDER/guidance/6419fnl.pdf>
- Fehrenbach, R., Comberbach, M., and Pêtre, J. O. 1992. On-line biomass monitoring by capacitance measurement. *Journal of Biotechnology*. 23(3): 303-314. [http://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90077-M](http://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90077-M)
- Glasse, J., Gernaey, K. V., Clemens, C., Schulz, T. W., Oliveira, R., Striedner, G., and Mandenius, C.-F. 2011. Process analytical technology (PAT) for biopharmaceuticals. *Biotechnology Journal*. 6(4): 369-377. <http://doi.org/10.1002/biot.201000356>
- Grein, T. A., Schwebel, F., Kress, M., Loewe, D., Dieken, H., Salzig, D., Czermak, P. 2017. Screening different host cell lines for the dynamic production of measles virus. *Biotechnology Progress*. 33(4): 989-997. <http://doi.org/10.1002/btpr.2432>
- Harris, C. M., Todd, R. W., Bungard, S. J., Lovitt, R. W., Morris, J. G., and Kell, D. B. 1987. Dielectric permittivity of microbial suspensions at radio frequencies: a novel method for the real-time estimation of microbial biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. 9(3): 181-186. [http://doi.org/10.1016/0141-0229\(87\)90075-5](http://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90075-5)
- Heileman, K., Daoud, J., and Tabrizian, M. 2013. Dielectric spectroscopy as a viable biosensing tool for cell and tissue characterization and analysis. *Biosensors and Bioelectronics*. 49: 348-359. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2013.04.017>
- Höber, R. 1912. Ein zweites Verfahren, die Leitfähigkeit im Innern von Zellen zu messen. *Pflüger's Archiv Für Die Gesamte Physiologie Des Menschen Und Der Tiere*. 148(4-5): 189-221. <http://doi.org/10.1007/BF01680784>
- Horta, A. C. L., Silva, A. J. da, Sargo, C. R., Cavalcanti-Montaño, I. D., Galeano-Suarez, I. D., Velez, A. M., Zangirolami, T. C. 2015. On-line monitoring of biomass concentration based on a capacitance sensor: assessing the methodology for different bacteria and yeast high cell density fed-batch cultures. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 32(4): 821-829. <http://doi.org/10.1590/0104-6632.20150324s00003534>
- Impe, J. Van, and E., N. 2002. The tuning of a model-based estimator for the specific growth rate of *Candida utilis*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 25(1): 1-12. <http://doi.org/10.1007/s004490100239>
- K'Owino, I. O., and Sadik, O. A. 2005. Impedance Spectroscopy: A Powerful Tool for Rapid Biomolecular Screening and Cell Culture Monitoring. *Electroanalysis*. 17(23): 2101-2113. <http://doi.org/10.1002/elan.200503371>
- Kim, Y.-H., Park, J.-S., and Jung, H.-I. 2009. An impedimetric biosensor for real-time monitoring of bacterial growth in a microbial fermentor. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 138(1): 270-277. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2009.01.034>
- Kiviharju, K., Salonen, K., Moilanen, U., and Eerikäinen, T. 2008. Biomass measurement online: the performance of in situ measurements and software sensors. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 35(7): 657-665. <http://doi.org/10.1007/s10295-008-0346-5>
- Kiviharju, K., Salonen, K., Moilanen, U., Meskanen, E., Leisola, M., and Eerikäinen, T. 2007. On-line biomass measurements in bioreactor cultivations: comparison study of two on-line probes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 34(8): 561-566. <http://doi.org/10.1007/s10295-007-0233-5>
- Markx, G. H., ten Hoopen, H. J. G., Meijer, J. J., and Vinke, K. L. 1991. Dielectric spectroscopy as a novel and convenient tool for the study of the shear sensitivity of plant cells in suspension culture. *Journal of Biotechnology*. 19(2-3): 145-157. [http://doi.org/10.1016/0168-1656\(91\)90055-Z](http://doi.org/10.1016/0168-1656(91)90055-Z)

- Mishima, K., Mimura, A., Takahara, Y., Asami, K., and Hanai, T. 1991. On-line monitoring of cell concentrations by dielectric measurements. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 72(4): 291-295. [http://doi.org/10.1016/0922-338X\(91\)90166-E](http://doi.org/10.1016/0922-338X(91)90166-E)
- Mulchandani, A., and Bassi, A. S. 1995. Principles and Applications of Biosensors for Bioprocess Monitoring and Control. *Critical Reviews in Biotechnology*. 15(2): 105-124. <http://doi.org/10.3109/07388559509147402>
- Negrete, A., Esteban, G., and Kotin, R. M. 2007. Process optimization of large-scale production of recombinant adeno-associated vectors using dielectric spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76(4): 761-772. <http://doi.org/10.1007/s00253-007-1030-9>
- Noll, T., and Biselli, M. 1998. Dielectric spectroscopy in the cultivation of suspended and immobilized hybridoma cells. *Journal of Biotechnology*. 63(3): 187-198. [http://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00080-7](http://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00080-7)
- Olguín-Sánchez, R. A., Rojas-Rendón, J. A., Díaz-Campillo, M. J., and Salazar, Y. 2009. Monitorización del crecimiento de microorganismos en sistemas cerrados utilizando espectroscopia de impedancia eléctrica. (Spanish). *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*. 30(2): 98-108.
- Opel, C. F., Li, J., and Amanullah, A. 2010. Quantitative modeling of viable cell density, cell size, intracellular conductivity, and membrane capacitance in batch and fed-batch CHO processes using dielectric spectroscopy. *Biotechnology Progress*. 1187-1199. <http://doi.org/10.1002/btpr.425>
- Pethig, R., and Kell, D. B. 1987. The passive electrical properties of biological systems: their significance in physiology, biophysics and biotechnology. *Physics in Medicine and Biology*. 32(8): 933-70.
- Pohlscheidt, M., Charaniya, S., Bork, C., Jenzsch, M., Noetzel, T. L., and Luebbert, A. 2013. Bioprocess and Fermentation Monitoring. In *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. Edited by Hoboken, NJ, USA: John Wiley and Sons, Inc. pp. 1471-1473. <http://doi.org/10.1002/9780470054581.eib606.pub2>
- Riley, M. 2006. Instrumentation and Process Control. In *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies (Biotechnology and Bioprocessing)*. Edited by O. Sadettin and H. Wei-Shou. CRC Press. 1st ed. pp. 249-298.
- Sanchis, A. 2009. Aplicación de la dielectroforesis a la caracterización dieléctrica de células. Universidad Complutense de Madrid.
- Sarrafzadeh, M. H., Belloy, L., Esteban, G., Navarro, J. M., and Ghommidh, C. 2005. Dielectric monitoring of growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters*. 27(7): 511-517. <http://doi.org/10.1007/s10529-005-2543-x>
- Schwan, H. P. 1957. Electrical Properties of Tissue and Cell Suspensions. In *Advances in biological and Medical Physics*. Edited by J. Lawrence and C. Tobias. Academic Press Inc. pp. 147-209. <http://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3111-2.50008-0>
- Senner, A. 1994. Fundamentos de corriente alterna. In *Principios de electrotecnica*. Barcelona: Reverté. pp. 124-157.
- Teixeira, A. P., Oliveira, R., Alves, P. M., and Carrondo, M. J. T. 2009. Advances in on-line monitoring and control of mammalian cell cultures: Supporting the PAT initiative. *Biotechnology Advances*. 27(6): 726-732. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.05.003>
- Tibayrenc, P., Preziosi-Belloy, L., and Ghommidh, C. 2011. On-line monitoring of dielectrical properties of yeast cells during a stress-model alcoholic fermentation. *Process Biochemistry*. 46(1): 193-201. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.007>
- Yardley, J. E., Kell, D. B., Barrett, J., and Davey, C. L. 2000. On-Line, Real-Time Measurements of Cellular Biomass using Dielectric Spectroscopy. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 17(1): 3-36. <http://doi.org/10.1080/02648725.2000.10647986>



INVESTIGACIÓN +

POSGRADOS

- Maestría en Biotecnología Aplicada
- Maestría en Biotecnología Productiva
- Doctorado en Biotecnología Aplicada
- Doctorado en Biotecnología Productiva



Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada
Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal
Tecuexcomac - Tepetitla K. 1.5, Tlaxcala, C.P. 90700, México