

Revista de la Sociedad Mexicana de  
**Biotechnología**  
y Bioingeniería A.C.

Año 2011 Volúmen 15 Número 1  
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de  
Biotechnología y Bioingeniería



# Revista de la Sociedad Mexicana de **Biología** y Bioingeniería A.C.

## **MESA DIRECTIVA**

Dr. Alfredo Martínez Jiménez  
**Presidente**

Dr. Gerardo Saucedo Castañeda  
**Vice-Presidente**

Dr. Octavio Loera Corral  
**Secretario**

Dr. Mauricio Trujillo Roldán  
**Tesorero**

Dra. Romina Rodríguez Sanoja  
**Subsecretaria**

Dr. Carlos Regalado González  
**Vocal Profesional**

M. en B. María Teresa Torres Mancera  
**Vocal Estudiante**

## **COORDINADOR EDITORIAL**

Ing. Rubén Castillo Alamilla

## **FORMACION EDITORIAL**

Ing. Rubén Castillo Alamilla  
M. en C. Ofelia Edith Carreón Rodríguez

## **COMITÉ EDITORIAL**

Dr. Sergio Sánchez Esquivel  
**Editor en Jefe**  
**Instituto de Investigaciones**  
**Biomédicas, UNAM**

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera  
**CINVESTAV**

Dr. Fernando Luis García Carreño  
**CIBNOR**

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas  
**UAM-I**

Dra. Romina Rodríguez Sanoja  
**Instituto de Investigaciones**  
**Biomédicas, UNAM**

Dra. Sara Solís Pereira  
**Instituto Tecnológico de Mérida**

Dra. Elizabeth Langley McCarron  
**Instituto Nacional de Cancerología**

## **DISEÑO GRAFICO E IMAGEN**

Lic. Nayeli Quinto (**SODIO NET**)

## **ADSCRIPCIONES Y PUBLICIDAD**

Ing. Rubén Castillo Alamilla  
Tel: (55) 5849 5859  
Email: [smbiotec@yahoo.com.mx](mailto:smbiotec@yahoo.com.mx)

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM). Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1999-082516265000-101. Los Conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Del. Tlalpan, México, D.F. Tiraje 500 ejemplares

# Índice

---

## Editorial

### **El quehacer biotecnológico: balance entre aplicación utilitaria y bases fundamentales de los bioprocesos**

Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López **4**

**Instrucciones para autores **6****

## ARTÍCULOS

### **Invertasa del Género *Aspergillus* y su Impacto Biotecnológico**

Fabiola Veana, Cristóbal Noé Aguilar, José María Viader-Salvadó y Raúl Rodríguez-Herrera **11**

### **Ingeniería de vías metabólicas en *Escherichia coli* para la producción de Shikimato como precursor para la síntesis de compuestos antivirales contra influenza.**

Larisa Cortés-Tolalpa, Susy Beatriz Carmona, Ania Cervantes-Salinas, Marco Antonio García, Guillermo Gosset, Adelfo Escalante\*, Francisco Bolívar **30**

### **Informe Final MDN 2008-2010**

Dra. Ma. Luisa Villareal **48**

### **Toma de Protesta MDN 2010-2012**

Dr. Alfredo Martínez Jiménez **58**

**XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería **61****

Biotecnología, Año 2011, Vol. 15 No.1

### **“El quehacer biotecnológico: balance entre aplicación utilitaria y bases fundamentales de los bioprocesos”**

La biotecnología está fuertemente influenciada por las tendencias mundiales de intercambio científico y económico; la macroeconomía y los mercados globalizados ejercen una fuerte influencia y presión sobre el quehacer biotecnológico lo cual queda de manifiesto con el hecho de que el germoplasma tiene niveles altos de producción y sus precios de venta y manipulación son difíciles de definir en términos de los marcos legales y regulatorios. La bioética y la bioseguridad son, pues, protagonistas muy importantes dentro de esta disciplina.

Avances en técnicas de recombinación han conducido a la elaboración de diversos productos y los procedimientos de desarrollo e implementación de los mismos con una base científica han alcanzado niveles globales, en tanto que las bases fundamentales de la ingeniería de bioprocesos y el *know-how* para diseño de equipos, no han sido adecuadamente extendidos. En este sentido, la aplicación utilitaria de los avances en biotecnología, se ha adelantado al entendimiento fundamental del desarrollo de bioprocesos.

Como ejemplos de lo mencionado anteriormente, existen varias técnicas de separación, que están compuestas por operaciones combinadas (además de las unitarias) y por tecnologías innovadoras para el diseño de la estructura y la arquitectura de los materiales biológicos, incluyendo productos basados en la nanociencia y en la nanotecnología. Gracias a esto, con el fin de lograr la síntesis de bioprocesos que resulten eficientes y robustos, las industrias colaboran estrechamente con científicos y utilizan, además de los fundamentos tradicionales de fisicoquímica y microbiología, dinámica no lineal, física del estado sólido, nanociencia y nanotecnología y así, la proteómica y la genómica han desempeñado funciones importantes en la fabricación de materiales basados en biología molecular. Asimismo, la biología de sistemas, definida como el análisis cuantitativo de las interacciones dinámicas entre componentes de un sistema biológico, y que tiene por objeto la comprensión del comportamiento de los sistemas como un todo en lugar del comportamiento de sus componentes individuales, ha alcanzado gran importancia en campos de ingeniería aplicada, incluyendo a la bioingeniería.

Lo anterior podría invitar a plantear reflexiones sobre las actividades llevadas a cabo dentro de la ingeniería de bioprocesos, tales como:

¿Realmente diseñamos productos y/o procesos considerando capacidades ingenieriles avanzadas que se encuentran disponibles?

¿Estamos contribuyendo a proveer soluciones fundamentales a procesos basados en regímenes turbulentos?

¿Elaboramos productos biológicos con la eficiencia máxima alcanzable de procesamiento?

¿Estamos conscientes de que las líneas de producción frecuentemente tienen más de un “cuello de botella”? ¿Es posible suprimir éstos y no crear otros?

Considerando una línea de producción que entrega “n” productos e involucra “n” operaciones, ¿somos capaces de incrementar o reducir las tasas de producción individuales sin afectar el plan de eficiencia y la entrega de cualquiera de los “n” productos involucrados?

¿Cuál es nuestro nivel de dominio de los fundamentos de las operaciones unitarias y combinadas involucradas en el procesamiento?

¿Tenemos en mente que las operaciones combinadas tales como la pervaporación, la micelización inversa y la pertracción de afinidad tendrán un papel importante en áreas relacionadas con la biotecnología?

¿Hasta qué grado somos conscientes de la importancia de los productos basados en ingeniería y de la ingeniería de productos con fines de innovación?

¿Hasta qué punto somos capaces de trabajar en procesos de multinivel y encontrar relaciones sobre el funcionamiento de un biosistema a partir de sus elementos?

No es sencillo formular respuestas a las preguntas anteriores, y los biotecnólogos deben considerar cada caso por separado y resolver situaciones particulares teniendo en cuenta aproximaciones integradas y equipos de trabajo multi e interdisciplinarios que se propongan acortar las distancias entre los principios fundamentales y las aplicaciones utilitarias dentro del trinomio: estructura-función-proceso.

Gustavo Fidel Gutiérrez López  
Profesor-Investigador Titular y  
Coordinador del Programa de Doctorado en Alimentos  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional  
Expresidente de la SMBB  
[gusfgl@gmail.com](mailto:gusfgl@gmail.com)  
[www.encb.ipn.mx](http://www.encb.ipn.mx)

# Instrucciones para los autores

## Guía de Autores

La revista puede recibir trabajos de investigación original así como de revisión en los campos de la biotecnología y bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

Los idiomas de la revista son Español e Inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Se recomienda que los trabajos completos tengan un máximo de 25 páginas, escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones de trabajos originales y revisiones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml,  $\mu$ l), de peso (kg, g, mg,  $\mu$ g), DNA, RNA y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde sus aspectos fundamentales hasta las aplicaciones de los mismos, incluyendo: microbiología, bioquímica y biología molecular, procesos y proyectos, así como biotecnología marina y biotecnología aplicada a la salud, alimentos, agricultura, veterinaria, enzimas y ambiente.

Los trabajos de investigación original serán divididos en las siguientes secciones: **Introducción, Materiales y métodos, Resultados, Discusión, Referencias y Agradecimientos**. Las secciones de **Resultados y Discusión** pueden presentarse combinadas.

Los trabajos de revisión incluirán el tema y subtemas que a juicio de los autores sean necesarios para la mejor presentación de la información. Estos trabajos pueden cubrir los siguientes contenidos:

1. ¿Qué es y para qué sirve la Biotecnología?. Es decir: descripciones que ilustren y divulguen los distintos campos de la biotecnología, sus alcances y limitaciones, su historia y sus perspectivas.
2. Las fronteras de la biotecnología: revisiones de nuevos campos o nuevas aplicaciones de la biotecnología. Por ejemplo: las perspectivas del uso de los genomas para el desarrollo de nuevas drogas o para el tratamiento de enfermedades metabólicas. Las perspectivas de la genómica (estudio sistemático de los genes y sus aplicaciones), la proteómica (predicción de la expresión de los genes en proteínas funcionales) y la fenómica (predicción de fenotipos o conductas de los organismos, en base a sus genes y a sus proteínas). El uso de la ingeniería genética para hacer

# Instrucciones para los autores

ingeniería metabólica. Los nuevos tipos de reactores biológicos y los fenómenos de transporte implicados. Los nuevos esquemas de reacción, separación y control en procesos biotecnológicos.

3. Aplicaciones de la Biotecnología para resolver problemas o atender necesidades de la sociedad, con especial atención a sus aplicaciones ya vigentes en México. Esta sección será dedicada a una empresa o institución (pública o privada) que desee difundir los logros obtenidos en algún campo de la biotecnología. Por ejemplo: empresas productoras de antibióticos o productos biológicos, empresas de ingeniería ambiental que usen procesos biotecnológicos, empresas agropecuarias, forestales o de acuicultura que usen tecnologías biológicas avanzadas, o empresas de transformación de alimentos que utilicen enzimas, cultivos de microorganismos, etc. Esta lista es indicativa pero no exhaustiva.
4. Problemas de bioseguridad, bioética y biodiversidad relacionados con las aplicaciones de la biotecnología a la sociedad. Por ejemplo: análisis y comentarios sobre los debates acerca del uso de semillas transgénicas, los problemas de conservación y explotación de la biodiversidad mediante la biotecnología, los riesgos del uso de organismos transgénicos en diversos campos de la industria, los problemas de bioseguridad del uso de antibióticos y otros productos biotecnológicos.
5. La educación, la cultura y la difusión tecnológica en relación con la biotecnología. Por ejemplo: comentarios de planes y programas, de estilos y necesidades de la enseñanza, del enfoque interdisciplinario, en carreras o planes de estudio directamente ligados con la biotecnología. También necesidades y modalidades sobre programas de extensión educativa para la industria, para el público consumidor o para grupos selectos de personas interesadas en la biotecnología (políticos, funcionarios de empresas, líderes de opinión). El uso de la informática en la difusión de la biotecnología, y en general, el análisis de necesidades, métodos y alternativas para difundir los conocimientos de la biotecnología.
6. Oportunidades y propuestas para mejorar la cooperación y el desarrollo biotecnológicos. Por ejemplo: Análisis de las oportunidades vigentes de intercambio académico o comercial en biotecnología. Propuestas de nuevas formas de cooperación entre los sectores de investigación y la industria biotecnológica. Análisis y propuestas del uso óptimo de recursos humanos, financieros o materiales para mejorar la cooperación o el desarrollo de la biotecnología. En esta sección se dará espacio a los análisis, críticas o propuestas de los aspectos legales y fiscales que afecten e incluso puedan mejorar el desarrollo de la biotecnología en México. Tales como: la propiedad industrial, el régimen fiscal de las empresas, el costo del desarrollo biotecnológico y los subsidios o estímulos económicos para el desarrollo de la biotecnología.

Tanto los trabajos de investigación original como las revisiones deberán apegarse al siguiente formato:

1. El título del manuscrito será puesto en **negritas** con letra Arial o equivalente tamaño **14**. El título deberá estar centrado.

# Instrucciones para los autores

2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño **12**. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como el e-mail del autor corresponsal.

3. Se deberá añadir un **Resumen** de no más de 250 palabras en Español y un **Abstract** en Inglés de tamaño similar.

4. Se incluirán entre 3 a 6 **Palabras clave**: que permitan clasificar el artículo en una base de datos.

Estas palabras deberán de incluirse en Español y en Inglés (**Key words**:).

5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste se pondrá como primera línea en *cursivas* con letra Arial o equivalente tamaño **10**. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño **10**. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.

6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras. La impresión de las figuras e imágenes se hará en blanco y negro, por lo que se recomienda que muestren un buen contraste, en especial las figuras con varias líneas. Según el orden de aparición en el texto, las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto pero se anexarán en hojas separadas después de las **Referencias**.

7. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a tal fuente de información original, si ello fuera necesario. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: "Martínez & García (1999) han demostrado que...", o bien, "Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...". Si la cita posee varios autores se escribiera como sigue: "Gutiérrez *et al.* (2003), han demostrado..." O bien: "Datos recientes (Gutiérrez *et al.*, 2003) han mostrado..." Si la cita es de una página de Internet, ésta deberá ponerse completa entre paréntesis directamente en el texto donde se mencione. La lista de **Referencias** se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño **10**) de acuerdo al siguiente formato:

# Instrucciones para los autores

## **Para revistas:**

García-Carreño F, Cota K & Navarrete del Toro MA (2008) Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*: conversion, characterization of catalytic properties, and role in postmortem melanosis. *J. Agric. Food Chem.* 56: 6454-6459.

## **Para libros y capítulos de libros:**

(Libro)

Ullrich M (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press, Norwich.

(Capítulo de libro)

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. *In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB)*. Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

## **Para patentes:**

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor-antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

**Para congresos y reuniones:** *Se aceptarán un máximo de dos citas de este tipo.*

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solís S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del Complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de *Aspergillus HL*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

**Para citas provenientes de internet:** *Se aceptará un máximo de dos citas de este tipo.*

Van Deuren J, Wang Z & Ledbetter J (1997) Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 3<sup>a</sup> Ed. *Technology Innovation Office, EPA*. Disponible en: <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.

## **Revistas electrónicas:**

Sun J, Lu X, Rinas U, & Zeng AP (2007) Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. *Genome Biol.* 8: R182.

# Instrucciones para los autores

## Para tesis de pre y posgrado:

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la Producción de safranal. Tesis de Maestra en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-78.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea. Las citas de internet, congresos y reuniones, deberán evitarse al máximo.

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos.

Los trabajos solamente se reciben vía correo electrónico en la dirección [smbiotec@yahoo.com.mx](mailto:smbiotec@yahoo.com.mx). Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor corresponsal, por lo que se pide incluir una dirección de correo electrónico para este fin, así como para mantener comunicación con el editor sobre la evolución de la revisión y sobre la aceptación del mismo.

Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, el trabajo se publicará en línea y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC <http://www.smbb.com.mx/>. La publicación en línea precederá a la publicación impresa.

## Invertasa del Género *Aspergillus* y su Impacto Biotecnológico

Fabiola Veana<sup>1\*</sup>, Cristóbal Noé Aguilar<sup>1</sup>, José María Viader-Salvadó<sup>2</sup> y Raúl Rodríguez-Herrera<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. Venustiano Carranza y José Cárdenas s/n. República Oriente. C.P. 25280, Saltillo, Coahuila.*

\*E-mail: [f\\_veana@hotmail.com](mailto:f_veana@hotmail.com)

<sup>2</sup>*Instituto de Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Pedro de Alba s/n y Av. Manuel L. Barragán. C. P. 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León.*

### RESUMEN

La invertasa es importante en la industria alimentaria para la obtención de confites y edulcorantes artificiales. Los hongos filamentosos pueden ser inducidos para secretar enzimas de interés industrial, dentro de ellas, la invertasa. El género *Aspergillus* ha demostrado ser buen productor de esta enzima mediante fermentación en cultivo sumergido. Antes de que la enzima sea caracterizada, necesita ser sometida a purificación, en esta etapa se han utilizado herramientas cromatográficas. Dentro de dichas herramientas destacan la cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular, además de FPLC. En la caracterización de la enzima se ha estudiado el efecto del pH y temperatura sobre la estabilidad y actividad enzimática, principalmente. Por otro lado, la tecnología del ADN recombinante, es un área prometedora que permitirá mejorar los rendimientos de la enzima mediante un sistema de expresión heteróloga.

**Palabras clave:** *Aspergillus*,  $\beta$ -fructofuranosidasa, cultivo sumergido, cromatografía, invertasa, proteína recombinante.

### ABSTRACT

Invertase is important in food industry for candy production and artificial sweeteners. Filamentous fungi are considered micro-organisms capable of being induced to secrete enzymes of industrial interest, including, invertase. *Aspergillus* species have demonstrated to be good producers of the enzyme by submerged culture. Before characterizing the enzyme, purification is needed. Chromatographic tools have been applied for this purpose. These tools include ion exchange chromatography and molecular exclusion, besides FPLC. In the

characterization of the enzyme, the effect of pH and temperature on the stability and enzymatic activity have been mainly studied. Furthermore, recombinant DNA technology is a promising area that will improve enzyme yields by an heterologous expression system.

**Key words:** *Aspergillus*,  $\beta$ -fructofuranosidase, chromatography, invertase, recombinant protein, submerged culture.

## INTRODUCCIÓN

La invertasa, conocida también como  $\beta$ -fructofuranosidasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de sacarosa en glucosa y fructosa. Se emplea en la industria farmacéutica y alimentaria, especialmente en la obtención de productos de confitería (Ashokkumar *et al.*, 2001), tales como chocolates, bombones, miel sintética, mermelada y confituras en general, así como también en la obtención de edulcorantes artificiales y en la industria cervecera (Cheetham, 1991).

Por otro lado, la enzima además de tener actividad de hidrólisis, en condiciones de altas concentraciones de sustrato (sacarosa) puede tener actividad fructosiltransferasa, para la síntesis de fructooligosacáridos (FOS), tales como cestososa, nistososa y 1-fructofuranosil-nistososa, los cuales son de bajo contenido calórico. Estos compuestos tienen un impacto en la salud, puesto que mejoran la microflora intestinal y previenen enfermedades cardiovasculares, cáncer de colon u osteoporosis (Linde *et al.*, 2009).

La producción de invertasa ha sido reportada en *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Xanthophyllomyces*

(Reddy *et al.*, 2010) y hongos filamentosos del género *Aspergillus*, *Aureobasidium* y *Penicillium* (Mussato *et al.*, 2009). Sin embargo, industrialmente, *S. cerevisiae* es el microorganismo de elección para la obtención de la enzima debido a su alta capacidad de fermentación de sacarosa y por ser una cepa hiper-productora de invertasa (Haq & Ali 2005). No obstante, a nivel industrial, para la producción de FOS las enzimas que se emplean (invertasa y fructosiltransferasa) se obtienen de *Aspergillus niger* y *Aureobasidium pullulans* (Cuervo-Fernández *et al.*, 2007), debido a que la producción de FOS por levaduras no es muy común: los niveles de estos compuestos que se han reportado para *Kluyveromyces* sp. y *Candida* sp. se encuentran entre 12 y 44% (Hernalsteens & Maugeri 2010), mientras que *A. niger* y *A. japonicus* producen entre 50-60% de FOS (Dorta *et al.*, 2006; Hernalsteens & Maugeri 2010).

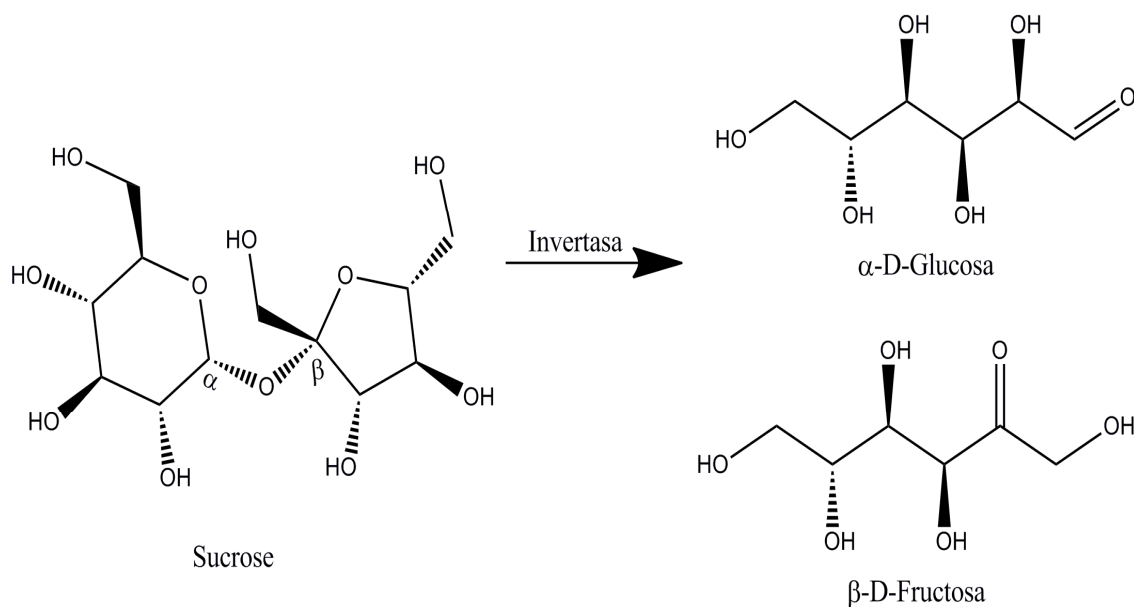
De acuerdo con los antecedentes anteriores, en el presente trabajo se revisan y discuten algunas de las investigaciones más recientes sobre la producción de invertasa por cepas del género *Aspergillus*, purificación y caracterización de la enzima, así también

se presentan avances en el campo poco estudiado de la obtención de invertasas recombinantes.

## GENERALIDADES DE INVERTASA

La invertasa también llamada  $\beta$ -D-fructofuranosidasa (1,2- $\beta$ -D-fructofuranosidofructohidrolasa Ec. 3.2.1.26) cataliza la hidrólisis de residuos terminales no reductores  $\beta$ -D-fructofuranosido en  $\beta$ -fructofuranosidos

(Romero, 2001; Mejorado, 2006). El resultado de la reacción de hidrólisis (Figura 1) es una mezcla de glucosa y fructosa denominada “azúcar invertido”, debido a la inversión de sus propiedades ópticas de una rotación positiva de la sacarosa [ $+66^\circ$ ] a una rotación negativa que es promedio de la rotación de la glucosa [ $+52^\circ$ ]



**Fig. 1.** Reacción de hidrólisis de la invertasa.

y de la fructosa [ $-92^\circ$ ] (Badui, 1993). Además de utilizarse la sacarosa como sustrato específico para la producción de invertasa, también la enzima se puede inducir por otros

compuestos, tales como la inulina y la rafinosa (Rubio *et al.*, 2002).

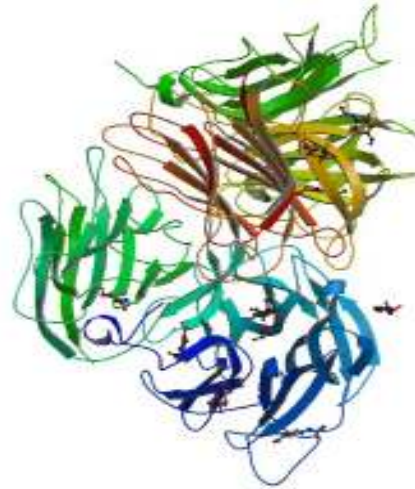
## GÉNERO DE *ASPERGILLUS* COMO PRODUCTOR DE INVERTASA

El hongo filamentoso *A. niger* es generalmente considerado como seguro (GRAS) y es extensamente empleado en biotecnología para la producción de ingredientes alimentarios, farmacéuticos y en la industria enzimática. Este microorganismo secreta grandes cantidades y variedades de enzimas, por lo cual es seleccionado para la producción enzimática en fermentación en estado sólido (SSF) y en cultivo sumergido (SmC) (Berka et al., 1992; Pandey et al., 1999). Sin embargo, de acuerdo a estudios reportados en la literatura y a la información de la base de datos Carbohydrate-Active Enzyme (CAZY), la invertasa es producida también por otras especies de *Aspergillus*, tales como *A. ficcum* (Peberdy 1993; James & Simpson 1996), *A. fumigatus* (Rezende & Felix, 1999; Mátrai et al., 2000), *A. flavus* (Mátrai et al., 2000; Uma et al., 2010), *A. japonicus* (Hayashi et al., 1992; Mussato et al., 2009), *A. nidulans* (Vainstein & Peberdy, 1991) y *A. oryzae* (Mátrai et al., 2000; Kurakake et al., 2008).

## ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA ENZIMA

De acuerdo con la base de datos PDB (Protein Data Bank) de RSCB (Research Collaboratory for Structural

Bioinformatics) no se encuentran estructuras tridimensionales de la invertasa de hongos filamentosos, solamente la correspondiente a *Schwanniomyces occidentalis* (Fig. 2).



**Fig. 2.** Estructura tridimensional de la invertasa de *Schwanniomyces occidentalis*

La cual posee 2 dominios conservados: cadena A y B con los extremos N-terminal y C-terminal, respectivamente, que corresponden a la familia glicosil hidrolasa 32 (GH32). Esta familia incluye invertasa, levanasa, inulinasa y levan sacarasa de origen bacteriano, fúngico y vegetal. La invertasa de *Sw. occidentalis* posee 474 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 119 kDa (Álvaro-Benito et al., 2010). Los dominios funcionales de la familia GH32 también se han identificado en *A. niger*, *A. nidulans* y *A. fumigatus* (Yuan et al. 2006).

## REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE INVERTASA EN *A. NIGER*

Los hongos filamentosos sintetizan y secretan en grandes cantidades sólo las enzimas hidrolasas necesarias para degradar algunos componentes del medio en el cual se desarrollan. De acuerdo con Pel *et al.* (2007), *A. niger* secreta el 77% de enzimas al medio de cultivo, seguido de *A. oryzae*, *A. nidulans* y *A. fumigatus*. El mecanismo de inducción de invertasa de *A. niger* es diferente de aquel en levaduras, en las cuales la síntesis de la enzima es constitutiva (Rubio & Navarro, 2006) y los niveles de secreción de la enzima al medio de cultivo son muy bajos en comparación con los niveles que secreta *A. niger*. Por lo cual, a continuación se presenta el mecanismo de regulación de síntesis de invertasa de este microorganismo.

Rubio & Navarro (2006) describen un mecanismo de regulación de la síntesis de la enzima en *A. niger* (Fig. 3), en el cual existe interacción de moléculas de sacarosa con el receptor en la membrana celular generando señales químicas que podrían ser trasladadas y amplificadas por monofosfato de adenina cíclico (cAMP) en el núcleo celular comenzando la inducción de la síntesis de invertasa a nivel de ADN. El ARNm podría trasladar la información de la síntesis de invertasa a los ribosomas, para después ser sintetizada y secretada al espacio

periplásmico, o bien en la pared celular.

La secreción de proteínas por *A. niger* involucra transporte vía retículo endoplásmico, aparato de Golgi y vesículas de la membrana celular (Pel *et al.*, 2007).

## GENES CODIFICANTES DE INVERTASA

La secuenciación del genoma de *A. niger* ha permitido la identificación de enzimas, desarrollo de nuevos productos, mejoramiento de cepas e incremento de la eficiencia de procesos. Algunos autores han reportado el aislamiento y clonación del gen de invertasa de *A. niger*. Boddy *et al.* (1993) aislaron y clonaron el gen *suc1* de *A. niger* B60, cuyo tamaño es de 1.7 kb. Más tarde, Somiari *et al.* (1997) identificaron el gen *sir1* de *A. niger* IBT10sb, el cual posee 93.5% de similitud con *suc1*. Recientemente se identificó el gen *Ifv* de *A. niger* GH1, una cepa que posee altos rendimientos enzimáticos respecto a otros aislamientos de *A. niger*, compartiendo un 93 % de similitud con *suc1* (Veana, 2010). Por tanto, las características de estos genes llevan a la conclusión de que se trata del mismo gen, cuyo marco de lectura abierto (ORF) no es interrumpido por intrones, siendo que la codificación de la invertasa es realizada por el gen *suc1* (Yuan *et al.*, 2006; Pel *et al.*, 2007).

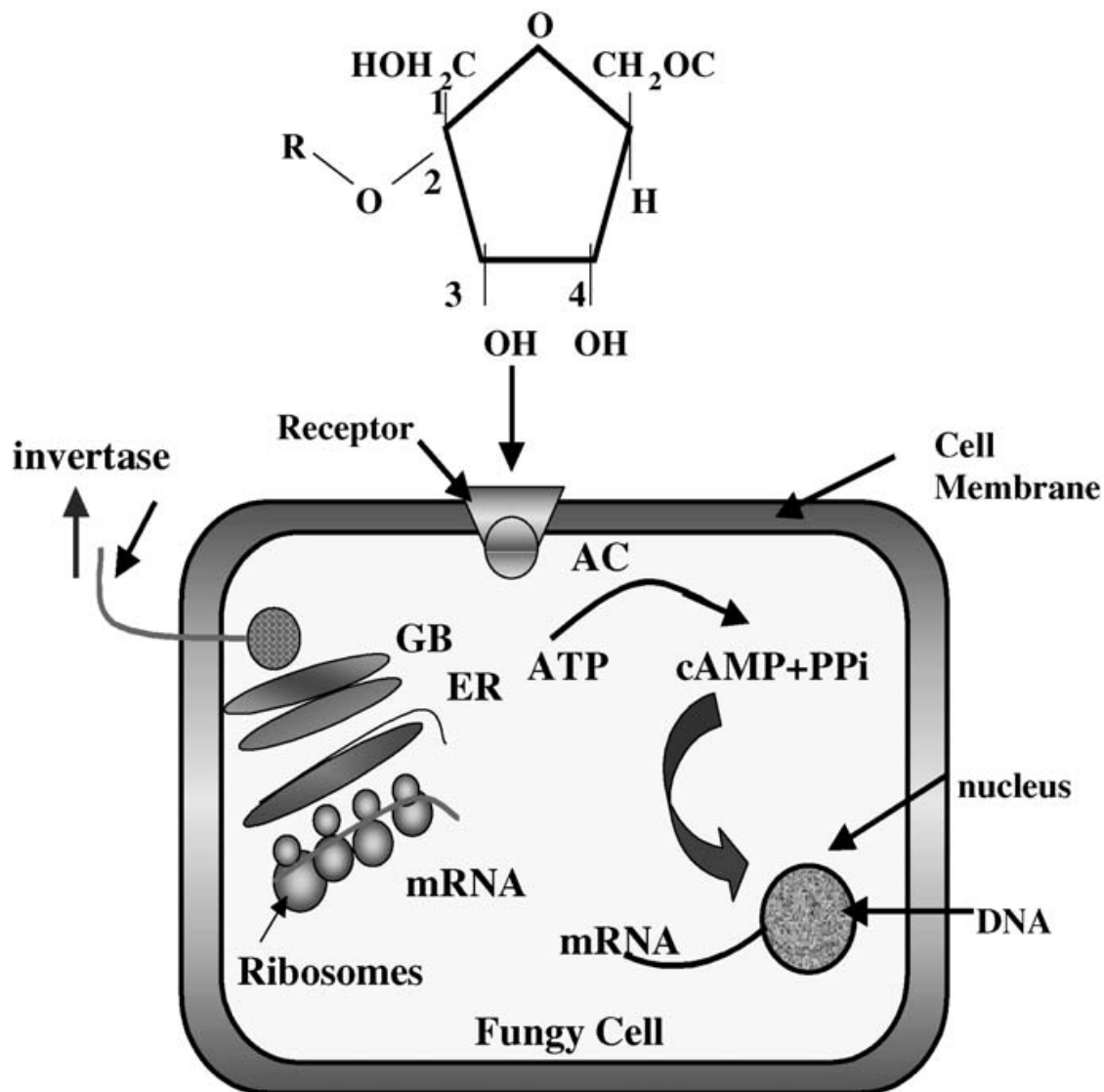


Fig. 3. Mecanismo de acción sugerido de la síntesis de invertasa de *A. niger*. Imagen tomada de Rubio & Navarro, 2006.

## EXPRESIÓN DE INVERTASA EN SmC

A nivel industrial, la producción de la enzima es en SmC, obteniéndose títulos enzimáticos que se encuentran en el rango de gramos por litro (Harvey & McNeil, 1993). A continuación se enuncian algunas investigaciones al

respecto.

Sirisansaneeyaku *et al.* (2000), evaluaron la producción intra y extracelular de invertasa de *A. niger* ATCC 20611 en fermentadores, cuya productividad (enzima producida por unidad de tiempo) obtenida fue de  $18900 \text{ U g células}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , 500 veces superior comparada con la productividad obtenida

empleando matraces como fermentadores. Lo anterior es debido al control de pH y temperatura que se puede lograr. Romero-Gómez *et al.* (2000) demostraron la capacidad de *A. niger* Aa20, N402 y C28B25 para la producción de  $\beta$ -fructofuranosidasa obteniendo un promedio de productividad de  $20 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Por otro lado, *A. oryzae* KB produce  $\beta$ -fructofuranosidasa, la enzima además de tener actividad de hidrólisis F2 ( $U_h$ ), puede tener actividad fructosiltransferasa F1 ( $U_f$ ). Kurakake *et al.* (2008) investigaron dos tipos de  $\beta$ -fructofuranosidasas, observando que F1 y F2 se obtienen en presencia de alta y baja concentración de sacarosa, respectivamente. Los niveles enzimáticos encontrados fueron de  $9.37$  y  $7.58 \text{ U ml}^{-1}$  para F1 y F2, respectivamente. El valor óptimo de pH de F1 y F2 es de  $5.0$  y  $6.0$ , respectivamente; F1 demostró ser más estable en un rango de  $5.0$ - $7.0$ , mientras que F2 en un rango de pH alcalino ( $4.0$ - $9.0$ ). La temperatura óptima a la que se registran los títulos más altos de F1 y F2 es alrededor de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  y estables a una temperatura de  $40$  y  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. Mientras tanto, Mussato *et al.* (2009) obtuvieron una alta actividad  $\beta$ -fructofuranosidasa de  $40.6 \text{ U ml}^{-1}$ , manteniéndose constante durante la fermentación en cultivo batch repetido empleando la cepa de *A. japonicus* ATCC 20236 inmovilizada con fibras vegetales.

## APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Actualmente se han empleado residuos agroindustriales como substratos en SSF y SmC para la obtención de enzimas de interés biotecnológico, entre otros usos. Ashokkumar *et al.* (2001) emplearon el bagazo de caña de azúcar como soporte para la fermentación en estado sólido para la optimización de la producción de invertasa por *Aspergillus niger* NRRL 330. Los autores obtuvieron una actividad enzimática de  $10735 \text{ U l}^{-1}$ .

Posteriormente, Vargas *et al.* (2004) evaluaron el efecto del ultrasonido sobre la producción de invertasa de *A. niger* CCT 7415, con el aprovechamiento de melaza de caña de azúcar como substrato. El objetivo de emplear el ultrasonido fue la extracción y liberación de la enzima intracelular. La máxima actividad enzimática obtenida por la cepa fue de  $179.17 \text{ U l}^{-1}$  a  $8$  min de sonicación con una energía estimada de  $297.6 \text{ J ml}^{-1}$ .

Más tarde, Rajoka & Yasmeen (2005), emplearon una cepa mutante de *A. niger* NIAB 280 para la obtención de la enzima, empleando mazorcas de maíz, arroz pulido, cáscara del mismo y salvado de trigo. Se obtuvo que el mejor residuo lignocelulósico es el salvado de trigo, alcanzando una productividad de  $516 \text{ U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , cifra que supera 2 veces la

productividad que se obtiene con la cepa nativa.

Recientemente, Reddy *et al.* (2010) emplearon residuos agroindustriales para la expresión de invertasa de *A. niger* PSSF21 en SmC. Dentro de estos residuos se encuentran el salvado de trigo y arroz, hojas y cáscara de plátano, achicoria, aserrín y melaza de caña de azúcar. La máxima producción de la enzima ( $30.84 \text{ U ml}^{-1}$ ) se observa a las 96 h de cultivo con la utilización de harina de soya y melaza al 2% como fuente de nitrógeno orgánico y carbono, respectivamente. El pH y la temperatura óptima fueron de 3.5 y  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente; dicha temperatura muestra la alta termo-tolerancia de la enzima.

Por otra parte, Uma *et al.* (2010) utilizaron cáscaras de naranja, piña y granada como sustratos para la producción de invertasa de *A. flavus*. Se encontró que la mejor actividad enzimática obtenida por la cepa es de  $25.8 \text{ U ml}^{-1}$  empleando un 3% de inóculo en las 96 horas de cultivo.

## **PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA**

La purificación de proteínas es en sí la separación de las proteínas de interés de una mezcla compleja para su posterior caracterización. Esta metodología es necesaria antes de intentar comprender las interacciones de las proteínas con otras moléculas (Mathews *et al.*, 2002). Es sumamente importante mencionar que

no existe la técnica ni el esquema de purificación que permita purificar todo tipo de proteína, por lo que se debe desarrollar una estrategia para la purificación de cada proteína. Los requisitos para ello, son los siguientes: a) determinar la cantidad y pureza de la proteína necesaria para su uso posterior, b) conocer la mayor información relacionada con las fuentes y naturaleza de la proteína de interés y contaminantes en la preparación biológica y c) buscar la mejor fuente de la proteína de interés.

El primer paso en el estudio, purificación y caracterización de una proteína, es generalmente el lavado del tejido y la aplicación de una técnica que rompa las células del tejido: lisis. La separación del extracto proteico de los restos celulares se realiza generalmente por centrifugación, aunque una técnica de filtración puede ser útil.

La precipitación selectiva es un procedimiento que induce un cambio en la solución para que la proteína de interés o los contaminantes alcancen su punto isoeléctrico (el valor de pH en el que la sustancia tiene una carga de cero) y precipiten. Las técnicas de precipitación selectiva consisten en el empleo de sales, solventes orgánicos y polímeros; considerándose la más empleada la precipitación salina con sulfato de amonio. La alta solubilidad de la sal causa una competencia por el agua de la solución, causando que las proteínas menos hidrófilas pierdan agua en su

entorno y precipiten en orden de solubilidad (Prado-Barragán *et al.*, 1999).

El empleo de técnicas cromatográficas ha beneficiado la purificación de proteínas. Dentro de las técnicas empleadas se encuentra la filtración en gel, también conocida como cromatografía en gel y cromatografía de exclusión molecular (Molecular Exclusion Chromatography MEC). Este tipo de cromatografía realiza separaciones más discriminatorias basadas en el tamaño. Las columnas empleadas están rellenas de esferas porosas compuestas de un polímero insoluble pero altamente hidratado (dextrano, agarosa o poliacrilamida). Las marcas comerciales que se utilizan son Sephadex, Sepharose y Biogel, cuyo tamaño de poro es de 0.1 mm de diámetro. Las moléculas pequeñas se encapsulan y se distribuyen entre las esferas, permitiendo la fluidez de las moléculas grandes a través de la columna, las cuales son las de interés.

Por otro lado, se encuentra la cromatografía de intercambio iónico (Exchange Ion Chromatography, EIC), técnica más usada en la separación de proteínas en base a su carga neta. Si una proteína tiene una carga neta positiva a pH 7, ésta se unirá normalmente a una columna de esferas que contengan grupos carboxilos, mientras que una proteína con carga neta negativa, no lo hará. Las proteínas cargadas positivamente (proteínas catiónicas) se pueden separar en columnas de

carboximetil-celulosa (CM-celulosa) cargadas negativamente. Mientras que las proteínas cargadas negativamente (proteínas aniónicas) se pueden separar en columnas de dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa) cargadas positivamente (Berg *et al.*, 2008).

Un tipo de cromatografía líquida es FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), parecida a HPLC (High Performance Liquid Chromatography). La fase móvil consiste en un líquido que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria que suele ser una resina compuesta de perlas de agarosa reticulada con diferentes ligandos de superficie en función de la meta de purificación (Prado-Barragán *et al.*, 1999). Las columnas que se utilizan en FPLC pueden separar macromoléculas en función del tamaño, distribución de la carga, hidrofobicidad o en fase inversa (como la cromatografía de afinidad) (Verbeke & Verbruggen, 1996).

Hasta la fecha se han realizado estudios sobre producción y purificación de invertasa por hongos filamentosos, específicamente del género *Aspergillus* (tabla 1). De lo revisado en el presente trabajo, se observa que la combinación de las técnicas IEC, MEC y FPLC para la purificación de invertasa de *A. niger* IMI303386 (Nguyen *et al.*, 2005) es favorable, ya que la recuperación enzimática es del 41.8% con un factor de purificación de 49.8. Sin embargo, Dhananjay & Mulimani (2008)

# Artículos

recuperaron el 54% de invertasa mediante partición en tres fases (TTP), usando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y t-butanol para la precipitación de la enzima obtenida de *A. oryzae*. De acuerdo con la literatura, lo

anterior resalta el trabajo de Nguyen *et al.* (2005), debido a que la producción de invertasa de *A. niger* supera los niveles obtenidos por *A. oryzae*. (96.5 U vs 5.9 U, respectivamente).

**Tabla 1.** Purificación de invertasa producida por el género de *Aspergillus*.

Autor	Microorganismo	Pasos de purificación	Factor de purificación	Recuperación de la enzima (%)
Ettalibi & Baratti, 1987	<i>A. ficcum</i>	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 38 y 92%, MEC, IEC, y FPLC	3.5	0.9
Hiramaya <i>et al.</i> , 1989	<i>A. niger</i> ATCC 20611	$\text{Ca}(\text{OAc})_2$ 6% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 75%, IEC y MEC	51.6	10.0
Duan <i>et al.</i> , 1993	<i>A. japonicus</i> TIT-KJ1	Acetona 1:1, MEC y PIEF	8.8	46.0
Boddy <i>et al.</i> , 1993	<i>A. niger</i> B60	Ultrafiltración, centrifugación EC y MEC	23.0	9.9
Rubio & Maldonado 1995	<i>A. niger</i>	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45, 80%, MEC e IEC	8.6	0.8
Nguyen <i>et al.</i> , 2005	<i>A. niger</i> IMI303386	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80%, FPLC-IEC, MEC	49.8	41.8
Dhananjay & Mulimani, 2008	<i>A. oryzae</i>	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20-50%, TTP usando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y t-butanol	12.0	54.0
Uma <i>et al.</i> , 2010	<i>A. flavus</i>	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70%, diálisis, EIC	5.8	3.2

Nota: PIEF (Electroforesis preparativa de isoelectroenfoco); Factor de purificación: relación de la actividad específica ( $\text{U mg}^{-1}$ ) antes y después de la purificación.

## CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA ENZIMA

Dentro de las principales características de invertasas purificadas mencionadas en la sección anterior se encuentran las reportadas por Ettalibi & Baratti, (1987), quienes se encargaron de

purificar la invertasa de *A. ficcum*. El peso molecular de la enzima es de 84 kDa, el contenido de carbohidratos presentes (31%) revela que se trata de una glicoproteína cuya actividad enzimática es superior cuando se utiliza sacarosa como inductor en el SmC.

Posteriormente, Hiramaya *et al.* (1989) purificaron la invertasa de *A. niger* ATCC 20611, se estimó que el peso molecular de la enzima fue de 340 kDa. El pH óptimo de la enzima fue de 5.0-6.0 y la temperatura óptima de 50-60°C. El valor de la constante cinética de Michaelis  $K_m$  para la sacarosa fue de 0.29 M. Años más tarde, Boddy *et al.* (1993) caracterizaron la invertasa purificada de *A. niger* B60, cuya actividad se obtiene a un pH óptimo de 5.5 a 50 °C. El peso molecular de la enzima reducida se estimó por electroforesis en gel-SDS, el cual es de 115 kDa. Mientras que el peso molecular de la enzima nativa fue de 225-250 kDa, estimado por electroforesis sobre condiciones no desnaturizantes, lo cual sugiere que la proteína es un dímero de subunidades idénticas.

Rubio & Maldonado (1995) demostraron que la máxima actividad de invertasa de *A. niger* se observó a 60 °C y pH de 5.0. La afinidad de la enzima por el sustrato se expresó con las constantes cinéticas  $K_m$  (0.0625 mM), con sacarosa como sustrato y velocidad máxima  $V_{max}$  de 0.013 mol $min^{-1}$ . Estudios recientes (Nguyen *et al.*, 2005) de la purificación de la  $\beta$ -fructofuranosidasa de *A. niger* IMI303386 revelan que el peso molecular de la enzima es entre 120 y 130 kDa. Mediante el isoelectroenfoco se observaron dos isoformas con un pI de

5.4 y 4.4, lo que demuestra que la invertasa tiene al menos dos subunidades de igual peso molecular.

Por otro lado, la enzima actúa en un rango de pH de 5.0-6.5 con el óptimo a 5.5; la máxima actividad se registra a 50°C. La  $\beta$ -fructofuranosidasa es estable en un rango de 4.0-8.0 y entre 50 y 55 °C. Además, los iones metálicos  $Ba^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  presentan la mayor influencia sobre el incremento de la actividad enzimática. Finalmente, de acuerdo al análisis de carbohidratos, la  $\beta$ -fructofuranosidasa contiene un 17% de estos compuestos, considerándose que la enzima es una glicoproteína. Recientemente, Uma *et al.* (2010) caracterizaron la invertasa de *A. flavus*, la cual tiene un peso molecular de 67 kDa. El rango de pH en el cual actúa la enzima es de 5.0-7.0 con el óptimo de 6.0, la actividad de la enzima es estable a 50°C.

Finalmente, los parámetros cinéticos de la enzima purificada fueron calculados usando sacarosa, obteniéndose los siguientes valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  de 0.23 mg  $ml^{-1}$  y 15.8 U  $mg^{-1}$ , respectivamente. Dentro de los iones metálicos, el  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  favorecen la mayor actividad enzimática además actúan como protectores contra la desnaturización térmica.

## INVERTASA RECOMBINANTE

Actualmente, existe gran interés por las proteínas recombinantes cuyo espectro de aplicaciones es muy amplio, en el cual se incluye la industria alimentaria (Walsh & Headon 1994; Murray *et al.*, 2006). Se considera una proteína recombinante o heteróloga aquella proteína cuya síntesis se realiza en un organismo “huésped” distinto al organismo nativo (Walsh & Headon

1994), con el objetivo de lograr incrementar los niveles enzimáticos, a este procedimiento se le conoce también como clonación. A nivel industrial se emplean cepas de *S. cerevisiae*, *Pichia angusta* y *P. pastoris* para alcanzar este fin (Buckholz & Gleeson 1991; Cregg *et al.*, 2000).

Hasta la fecha, se ha investigado poco sobre la obtención de invertasa recombinante. En la tabla 2

**Tabla 2.** Estudios de sistema de expresión heteróloga de invertasa y otras enzimas

Autor	Enzima	Productor	Huésped
Bergès <i>et al.</i> , 1993.	Invertasa	<i>A. niger</i> B60	<i>T. reesei</i>
Narciandi <i>et al.</i> , 1995.	invertasa	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. angusta</i>
Kim <i>et al.</i> , 1999.	Endo-inulinasa	<i>A. ficcum</i> ATCC 16882	<i>S. cerevisiae</i>
Berrin <i>et al.</i> , 2000.	Endo-β-1,4-xilanasa	<i>A. niger</i>	<i>P. pastoris</i>
Heyer & Wendenburg, 2001.	Fructosil-transferasa	<i>A. sydowi</i> IAM 2544	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i>
Pérez <i>et al.</i> 2001.	invertasa	<i>P. anomala</i> CBS 5759	<i>S. cerevisiae</i>
Yanai <i>et al.</i> 2001.	invertasa	<i>A. niger</i> ATCC 20611	<i>S. cerevisiae</i>
Moriyama <i>et al.</i> , 2003.	Exo-inulinasa	<i>A. niger</i> cepa 12	<i>P. pastoris</i>
Raba'atun <i>et al.</i> , 2011.	Inulinasa	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>E. coli</i>

se enuncian algunas datos encontrados en la literatura acerca de invertasa y otras enzimas recombinantes pertenecientes a la familia de las glicosil-hidrolasas, utilizando *Trichoderma reesei*, *E. coli*, *S. cerevisiae*, *P. angusta* y *P. pastoris* como huéspedes. Sin embargo,

la mayoría de estas investigaciones hacen referencia a la clonación del gen codificante para la enzima en estudio, sin especificar si se ha logrado el mejoramiento de los rendimientos enzimáticos de producción.

Bergès *et al.* (1993) clonaron y expresaron el gen de invertasa (*suc1*) de *A. niger* B60 en *T. reesei*, dicho gen puede actuar como un marcador dominante selectivo para la transformación de *T. reesei*. Las clonas transformadas se evaluaron bajo condiciones de glucosa y sacarosa, obteniendo aproximadamente a las 3 h de cultivo 1.5 U g de micelio<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup> de cultivo adicionado con glucosa, hecho que era de esperarse, puesto que *T. reesei* es incapaz de utilizar la sacarosa como fuente de carbono. Por otro lado, la cepa *A. niger* B60 secretó a las 6 h al medio de cultivo adicionado con sacarosa como inductor, casi el doble de la actividad enzimática que presentaron los transformantes. Debido a esto último, es importante reconsiderar el huésped a utilizar en este tipo de sistemas de expresión, puesto que solamente se logró la clonación del gen *suc1*.

Heyer & Wendenburg (2001) expresaron la fructosiltransferasa de *A. sydowi* en *E. coli* y *S. cerevisiae*, ambos huéspedes carentes de actividad hidrolítica, por lo que fungen de modelos ideales de expresión. Como resultado de la investigación se encontró un nivel bajo de actividad fructosiltransferasa, usando como huésped a *S. cerevisiae*. Caso contrario el sucedido con *E. coli*, donde se detectó la expresión de la enzima en los cromatogramas (CEM), sin indicar los niveles alcanzados.

Por otra parte, Pérez *et al.* (2001) expresaron el gen de invertasa (INV1) de *P. anomala* en *S. cerevisiae*, donde se obtuvo un nivel eficiente de secreción de la enzima por los transformantes (6400 U l<sup>-1</sup>); pero no se menciona cuáles son los niveles de producción de enzima de *P. anomala*. Sin embargo, Yanai *et al.* (2001) demostraron que la expresión de  $\beta$ -fructofuranosidasa de *A. niger* ATCC 20611 en *S. cerevisiae* se ve mejorada ya que la relación  $U_i/U_h$  obtenida fue de 22.3 veces más alta que la reportada por *A. niger* ATCC 20611. Además la invertasa recombinante obtenida posee las mismas propiedades catalíticas que la enzima obtenida por *A. niger* ATCC 20611.

No obstante, el empleo de *S. cerevisiae* en los modelos de expresión heteróloga posee las desventajas de baja secreción de la proteína de interés al medio de cultivo y las posibles hiperglicosilaciones que se pudieran presentar. Mientras tanto, si bien es cierto que *E. coli* es bien conocida fisiológica y genéticamente, es de fácil manipulación y brinda altas densidades celulares, su aplicación posee los inconvenientes de formar cuerpos de inclusión insolubles en el citoplasma celular, además de poderse presentar la proteólisis celular y generar endotoxinas dañinas a la salud humana y animal (Cregg *et al.*, 2007).

Narciandi *et al.* (1995) expresaron el gen de invertasa *SUC2* de *S. cerevisiae* en *P. angusta*, evaluando la producción de invertasa recombinante en 2 medios

de cultivo adicionados con sacarosa y melaza de caña de azúcar por separado. Los autores afirman que se logra un incremento de la producción de la enzima en el medio rico en melaza de caña de azúcar (15000 vs 10000 U l<sup>-1</sup>) sin el establecimiento de una comparación con los niveles propios de *S. cerevisiae*.

Años más tarde, Moriyama *et al.* (2003) expresaron el gen de exoinulinasa de *A. niger* 12 en *P. pastoris*, observando un aumento de la actividad inulinasa e invertasa (16 y 101 U ml<sup>-1</sup>, respectivamente) y en la actividad específica de la proteína recombinante (55.5 y 293 U/mg de exoinulinasa e invertasa, respectivamente), esta última es superior a la actividad específica de la proteína nativa de *A. niger* (52.8 y 227 U mg<sup>-1</sup>, exoinulinasa e invertasa, respectivamente), ambas purificadas mediante MEC e IEC. Con lo anterior se puede afirmar que el uso de *P. pastoris* para la obtención de proteínas recombinantes es muy eficiente.

Dentro de las principales ventajas de *P. pastoris*, se encuentran la sencilla manipulación a nivel de laboratorio e industrial, se adapta a los cambios de escala en biorreactores y existe posibilidad de alcanzar altas concentraciones celulares, redituando en altas productividades enzimáticas. Además, de que la levadura no produce endotoxinas, la secreción de la proteína recombinante es eficiente y se logra

fácilmente su purificación (Gamboa & Trujillo-Roldán, 2009).

## CONCLUSIONES

El impacto biotecnológico de la invertasa producida por el género *Aspergillus* es bien conocido, así como también las características fisicoquímicas y métodos de purificación a los que se ha sometido la enzima. Sin embargo, es importante considerar que mediante la tecnología del ADN recombinante se puede incrementar los rendimientos de invertasa, comparados con los que los microorganismos producen naturalmente. Los sistemas de expresión heteróloga que han demostrado cumplir este objetivo son las levaduras, cuyo genoma y comportamiento metabólico ha sido estudiado. Esta perspectiva mejorará la industria alimentaria, específicamente la confitería, la cual emplea la invertasa en la elaboración de productos con alta demanda de consumo.

## REFERENCIAS

- Ashokkumar B, Nagarajan K & Paramasamy G (2001) Optimization of media for  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Proc. Biochem.*37: 331-338.
- Álvaro-Benito M, Polo A, González B, Fernández-Lobato M & Sanz-Aparicio J (2010) Structural and kinetic analysis of *Schwanniomyces*

- occidentalis* invertase reveals a new oligomerization pattern and the role of its supplementary domain in substrate binding. *J. Biol. Chem.* 285: 13930-13941.
- Badui D (1993) Química de los alimentos. Addison Wesley Longman. México.
- Berg JM, Stryer L & Tymoczko J (2008) Bioquímica. Editorial Reverté. Barcelona, España. pp 69-70.
- Bergès T, Barreu C, Peberdy JF & Boddy LM (1993) Cloning of an *Aspergillus niger* invertase gene by expression in *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.* 24:53-59.
- Berka RM, Dunn-Coleman N & Ward M (1992) Industrial enzymes from *Aspergillus* species. In: *Aspergillus* Biology and Industrial Applications, Bennett JW & Klich MA (eds). Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA. pp.155-202.
- Berrin JC, Williamson G, Puigserver A, Chaix JC, Russell MW & Juge N (2000) High-level production of recombinant fungal endo- $\beta$ -1,4-xylanase in the methylotrophic yeast *Pichiapastoris*. *Protein Exp. Purif.* 19: 179-187.
- Boddy LM, Bergés T, Barreau C, Vainstein MH, Dobson MJ, Ballance DJ & Peberdy JF (1993) Purification and characterization of an *Aspergillus niger* invertase and its DNA sequence. *Curr. Genet.* 24: 60-66.
- Buckholz RG & Gleeson MA (1991) Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnol.* 9: 1067-1072.
- Cheetham P (1991) Aplicación de los enzimas en la industria. En: Manual de Biotecnología de los Enzimas. Wiseman A (ed). Editorial Acribia, Zaragoza. pp. 267-374.
- Cregg JM, Cereghino JL, Jianying S & Higgins DR (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16(1): 23-52.
- Cregg JM (2007) *Pichia* Protocols. Human Press. United States of America.
- Cuervo-Fernández R, Ottoni CA, da Silva ES, Saito MRM, Carter JM, Magossi LR, Alves WMA, de Andrade RMF, Guilarte MB & Maiorano AE (2007) Screening of  $\beta$ -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 87-93.
- Dhananjay SK & Mulimani VH (2008) Purification of  $\alpha$ -galactosidase and invertase by three-phasepartitioning from crude extract of *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Lett.* 30: 1565-1569.
- Dorta C, Cruz R, de Oliva-Neto P & Moura DJC (2006) Sugarcane molasses and yeast powder used in the fructooligosaccharides production by *Aspergillus japonicus*-FCL 119T and *Aspergillus niger* ATCC 20611.J. *Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: 1003-1009.

# Artículos

- Duan KJ, Sheu DC & Chen JS (1993) Purification and characterization of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(11): 1811-1815.
- Ettalibi M & Baratti JC (1987) Purification, properties and comparison of invertase, exo-inulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 13-20.
- Gamboa R & Trujillo-Roldán MA (2009) Un acercamiento a la producción de proteínas recombinantes terapéuticas de uso humano, El Residente, IC Pfizer, 4(3): 87-91.
- Haq I & Ali S (2005) Invertase production from a hyperproducing *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from dates. *Pak. J. Bot.* 37(3): 749-759.
- Harvey M & McNeil B (1993) Liquid fermentation system and product recovery of *Aspergillus*. In: *Biotechnology Handbooks 7*. Smith JE (ed). Plenum Press, New York. pp. 141-176
- Hayashi S, Matsuzaki K, Takasaki Y, Ueno H & Imada K (1992) Production of  $\beta$ -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 155-159.
- Hernalsteens S & Maugeri F (2010) Partial purification and characterization of extracellular fructofuranosidase with transfructosylating activity from *Candida* sp. *Food Bioprocess Technol.* 3: 568-576.
- Hirayama M, Sumi N & Hidaka H (1989) Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agric. Biol. Chem.* 53: 667-673.
- Heyer AG & Wendenburg (2001) Gene cloning and functional characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of *Aspergillus sydowii* AM 2544. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(1): 363-370.
- James J & Simpson BK (1996) Application of enzymes in food processing. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36: 437-463.
- Kim HS, Lee DW, Ryu EJ, Uhm TB, Yang MS, Kim JB & Chae KS (1999) Expression of the *INU2* gene for an endoinulinase of *Aspergillus ficuum* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 21: 621-623.
- Kurakake M, Ogawa K, Sugie M, Takemura A, Sugiura K & Komaki T (2008) Two types of  $\beta$ -fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. *J. Agric. Food Chem.* 56: 591-596.
- Linde D, Macias I, Fernández-Arrojo L, Plou FJ, Jiménez A & Fernández-Lobato M (2009) Molecular and biochemical characterization of a  $\beta$ -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

# Artículos

- Appl. Environ. Microbiol.* 75(4): 1065-1073.
- Mathews CK, van Holde KE & Ahern KG (2002) *Bioquímica* 3ª ed. Ed. Addison Wesley. Madrid. pp. 168-170.
- Mátrai T, Mayera S, Kókai S & Salamon I (2000) Invertase production of common storage moulds in food and feed grains as a possibility for rapid detection of *Aspergillus flavus* group and *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Food Microbiol.* 61: 187-191.
- Mejorado MN (2006) *Confitería*. Industria Alimentaria. Alfa Editores Técnicos, México. pp. 10-17.
- Moriyama S, Tanaka H, Uwataky M, Muguruma M & Ohta K (2003) Molecular cloning and characterization of an exoinulinase gene from *Aspergillus niger* strain 12 and its expression in *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioeng.* 96 (4): 324-331.
- Murray PR, Rosenhtal KS & Pfaller MA (2006) *Microbiología Médica*. 5ª ed. Elsevier Mosbi, España. pp 45-46.
- Mussatto SI, Rodrigues LR & Teixeira JA (2009)  $\beta$ -Fructofuranosidase production by repeated batch fermentation with immobilized *Aspergillus japonicus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 923-928.
- Nguyen QD, Rezessy-Szabo JM, Bhat MK & Hoschke A (2005) Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386. *Process Biochem.* 40: 2461-2466.
- Narciandi RE., Rodriguez L, Rodriguez E, Díaz R. Delgado J &, Herrera L (1995) High level production of recombinant invertase in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Lett.* 17(9): 949-952.
- Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR & Nigam P (1999) Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.* 77: 149-162.
- Prado-Barragán LA, Huerta OS, Rodríguez SG & Saucedo CG (1999) *Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología*. Editorial Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México.
- Peberdy JF (1993) Protein secretion in *Aspergillus*: invertase as a model system. *J. Chem. Technol. Biotechnol. B-Biotechnol.* 56: 216-217.
- Pel HJ, de Winde J H, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, Vries RP, Albang R, Albermann K, Andersen MR Bendtsen JD, Benen JAE, van den Berg M, Breestraat S, Caddick MX, Contreras R, Cornell M, Coutinho PM, Danchin EGJ, Debets AJM, Dekker P, van Dijk PWM, van Dijk A, Dijkhuizen L, Driessen AJM, d'Enfert C, Geysens S, Goosen C, Groot GSP, de Groot PWJ, Guillemette T, Henrissat B, Herweijer M, van den Hombergh JPTW, van den Hondel CAMJJ, van der Heijden R TJM, van der Kaaij RM, Klis FM, Kools HJ, Kubicek CP, van Kuyk PA,

- Lauber J, Lu X, van der Maarel MJEC, Meulenberg R, Menke H, Mortimer MA, Nielsen J, Oliver SG, Olsthoorn M, Pal K, van Peij NNME, Ram AFJ, Rinas U, Roubos JA, Sagt CMJ, Schmoll M, Sun J, Ussery D, Varga J, Vervecken W, van de Vondervoort PJJ, Wedler H, Wösten HAB, Zeng A, van Ooyen AJJ, Visser J & Stam H (2007) Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat. Biotechnol.* 25: 221-231.
- Pérez JA, Rodríguez J, Ruiz T & Rodríguez L (2001) Expression of *Pichia anomala* INV1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in two different active forms of hypoglycosylated invertase. *Arch. Microbiol.* 175:189–197.
- Raba'atun AS, Shuhaimi M, MohdYazid AM, Manaf AA, Rosli N & Sreeramanan S (2011) Molecular cloning and sequence analysis of an inulinase gene from an *Aspergillus* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* Online First™, 18 February 2011.
- Rajoka MI & Yasmeen A (2005) Improved productivity of  $\beta$ -fructofuranosidase by a derepressed mutant of *Aspergillus niger* from conventional and non-conventional substrates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 471-478.
- Reddy PP, Reddy GSN & Sulochana MB (2010) Highly thermostable  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* PSSF21 and its application in the synthesis of fructo-oligosacharides from agro industrial residue. *Asian J. Biotechnol.* 2(2): 86-98.
- Rezende ST & Felix CR (1999) Production and characterization of raffinose-hydrolysing and invertase activities of *Aspergillus fumigatus*. *Folia Microbiol.* 44: 191-195.
- Romero-Gómez S, Augur C & Viniegra-González G (2000) Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged solid-state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 22: 1255–8.
- Romero G (2001) Producción de invertasa por *Aspergillus niger* en fermentación líquida y fermentación sólida. Tesis de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. México D.F. pp. 1-123.
- Rubio MC & Maldonado MC (1995) Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*. *Curr. Microbiol.* 31: 80-83.
- Rubio MC, Runco R & Navarro A (2002) Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. *Phytochem.* 61: 605-609.
- Rubio MC & Navarro AR (2006) Regulation of invertase synthesis in *Aspergillus niger*. *Enzym. Microb. Technol.* 39: 601–606.
- Sirisansaneeyakul S, Jitbanjongkit S, Prasomsart N & Luangpituksa P (2000) Production of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Kasetsart J. Nat. Sc.* 34: 378-386.

# Artículos

- Somiari RI, Brzeski H, Tate R, Bieleck S & Polak J (1997) Cloning and sequencing of an *Aspergillus niger* gene coding for  $\beta$ -fructofuranosidase. *Biotechnol. Lett.* 19(12): 1243-1247.
- Uma C, Gomathi D, Muthulakshmi C & Gopalakrishnan VK (2010) Production, purification and characterization of invertase by *Aspergillus flavus* in fruit peel waste as substrate. *Adv. Biol. Res.* 4 (1): 31-36.
- Vainstein M & Peberdy J (1991) Regulation of invertase in *Aspergillus nidulans*: effect of different carbon sources. *J. Gen. Microbiol.* 137 (3): 15-321.
- Vargas L. HM, Pião ACS, Domingos RN & Carmona EC (2004) Ultrasound effect on invertase from *Aspergillus niger*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 137-142.
- Veana HF (2010) Expresión, aislamiento y clonación del gen de invertasa de *Aspergillus niger* GH1. Tesis de Maestra en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coah. pp 1-57.
- Verbeke K & Verbruggen A Usefulness of fast protein liquid chromatography as an alternative to high performance liquid chromatography of 99m Tc-labelled human serum albumin preparations. *Pharm. J. Biomed.* 14 (8-10): 1209-13.
- Walsh H & Headon DR (1994) Protein Biotechnology. John Wiley and Sons (Editors). New York. pp. 13-15.
- Yanai K, Nakane A, Kawate A & Hirayama M (2001) Molecular cloning and characterization of the fructooligosaccharide producing  $\beta$ -fructofuranosidase Gene from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (4): 766-773.
- Yuan X, Goosen C, Kools H, van der Maarel MJEC, van den Hondel CAMJJ, Dijkhuizen L & Ram AFJ (2006) Database mining and transcriptional analysis of genes encoding inulin-modifying enzymes of *Aspergillus niger*. *Microbiology.* 152: 3061-3073.

## Ingeniería de vías metabólicas en *Escherichia coli* para la producción de shikimato como precursor para la síntesis de compuestos antivirales contra influenza.

Larisa Cortés-Tolalpa, Susy Beatriz Carmona, Ania Cervantes-Salinas, Marco Antonio García, Guillermo Gosset, Adelfo Escalante\*, Francisco Bolívar

<sup>1</sup>*Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210. México. \*[adelfo@ibt.unam.mx](mailto:adelfo@ibt.unam.mx). Tel. (Fax):*

*+52(55)5622 7648*

### RESUMEN

La influenza es una enfermedad respiratoria altamente infecciosa causada por retrovirus de la Familia Ortomixoviridae que poseen en su superficie dos glicoproteínas, la hemaglutinina y la neuraminidasa (NA). Las características biológicas de estos virus hacen que exista la posibilidad permanente de brotes de influenza con el riesgo de convertirse en pandemia. En la actualidad se emplea el inhibidor de la actividad de la NA, oseltamivir fosfato (OSF), elaborado por síntesis química a partir del shikimato (SHK) extraído de plantas de anís estrella chino para el tratamiento de influenza estacional, aviar y humana. Se ha estimado que en el caso de una pandemia, la capacidad de producción de SHK y OSF sería insuficiente para proteger a grandes poblaciones, particularmente de países en desarrollo. Una alternativa para la obtención de SHK es por procesos biotecnológicos utilizando cepas bacterianas modificadas por ingeniería de vías metabólicas (IVM). La aplicación de la IVM en *Escherichia coli* para la producción de SHK ha permitido la obtención de cepas sobreproductoras modificadas en el metabolismo central de carbono y en la vía de síntesis de compuestos aromáticos. En esta revisión se describen las aproximaciones de IVM aplicadas a cepas de *E. coli* para obtener derivadas sobreproductoras de SHK.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*, ingeniería de vías metabólicas, shikimato, compuestos antivirales, influenza.

### ABSTRACT

Influenza is a highly infectious respiratory disease caused by retroviruses members of the Ortomixoviridae Family. These viruses have on their surface two glycoproteins, hemagglutinin and neuraminidase (NA). The biological characteristics of these viruses cause a permanent possibility of

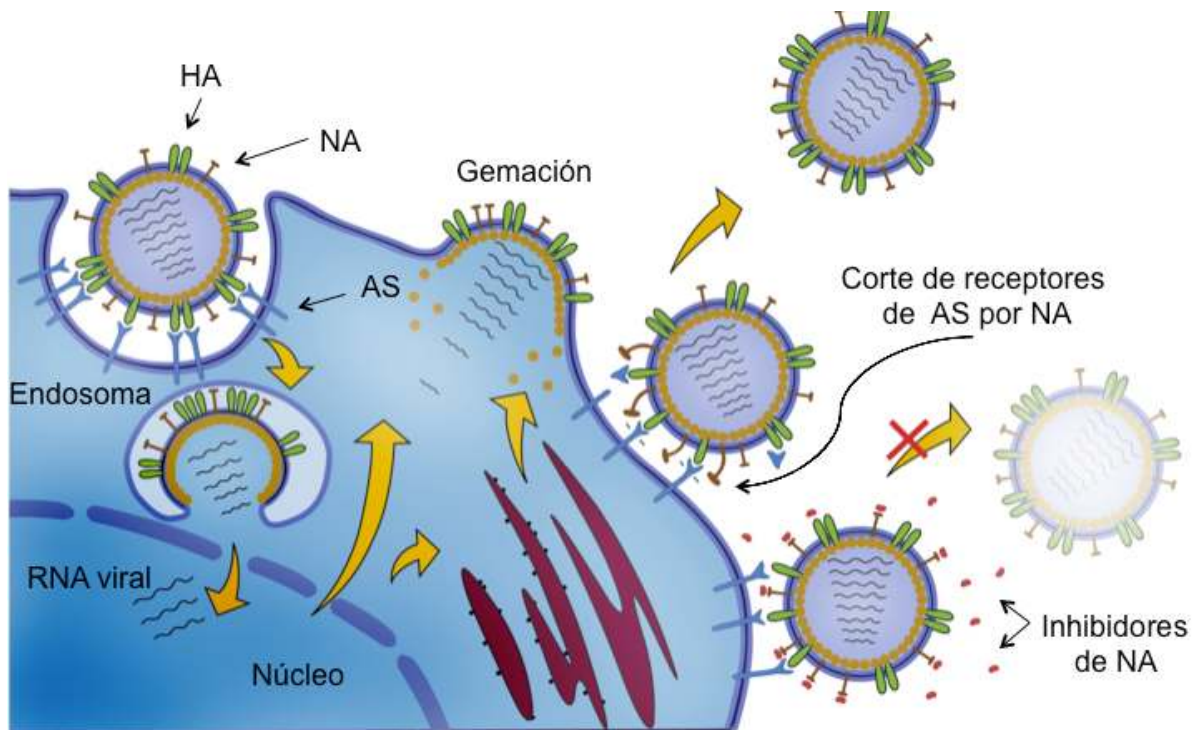
influenza outbreaks caused by mutant strains with the risk of a pandemic. Nowadays, sialic acid analogs such as oseltamivir phosphate (OSF), synthesized from shikimate (SHK) is used to inhibit the activity of viral NA in the treatment of seasonal, avian and human influenza. It has been estimated that in the case of a global pandemic of influenza, the present capacity of OSF production could be insufficient to protect large populations, particularly in developing countries. Thus, alternative biotechnological strategies with engineered strains to produce SHK have gained relevance. Application of metabolic engineering pathway (MEP) in *Escherichia coli* strains, in order to improve SHK production by fermentation, have resulted in overproducing strains in which some genes from central carbon metabolism and the common aromatic pathway have been modified. This review describes several MEP approaches applied to *E. coli* to obtain overproducing strains of SHK.

**Key words:** *Escherichia coli*, metabolic engineering, shikimic acid, antiviral drugs, influenza.

## INTRODUCCIÓN

La influenza es una enfermedad respiratoria altamente infecciosa causada por virus miembros de la Familia Ortomixoviridae, los cuales son retrovirus que poseen en su superficie dos glicoproteínas, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) (Figura 1), que definen las características antigénicas de cepas particulares de estos virus. Con base en la antigenicidad de estas proteínas, se clasifican 16 subtipos de HA (H1-H16) y 9 subtipos de NA (N1-N9). Las NA de los virus de influenza aviar que se han detectado en circulación pertenecen a dos grupos filogenéticos distintos: el grupo 1, conformado por los subtipos N1, N4, N5 y N8, mientras que el grupo 2 contiene a los subtipos N2, N3, N6, N7 y N9. Estas dos proteínas juegan un papel fundamental en el proceso de infección de células blanco y la liberación de nuevas partículas de virus: durante el proceso de infección, una vez que el virus ha entrado a las vías respiratorias y

ha alcanzado sus células blanco, la HA se une a los receptores de ácido siálico (AS) de la célula a infectar y permite la entrada del virus. Una vez que el virus se ha replicado, se libera por acción de la NA, la cual corta en un sitio específico al receptor de AS de la célula infectada a los cuales se encuentran adheridos los nuevos virus formados en la célula, permitiendo así su liberación y la continuación del proceso de infección de otras células blanco (Figura 1). Se propone que los virus de influenza aviar H5N1 y los de influenza humana H3N2 y H1N1 tienen diferentes células blanco receptoras en el tracto respiratorio humano: mientras que los virus derivados de humanos reconocen preferentemente los enlaces de SA $\alpha$ 2,6 Galactosa (Gal) localizados en las células epiteliales de las mucosas nasales, senos paranasales, faringe, tráquea y bronquios, mientras que los virus de aves reconocen los enlaces de AS $\alpha$ 2,3Gal localizados en las vías respiratorias bajas, en la pared alveolar y las uniones entre los



**Fig. 1.** Mecanismo de infección de virus de influenza a células blanco. Después de que el virus de influenza se une a los receptores de ácido siálico (AS) de la superficie celular por medio de la hemaglutinina (HA), los virus son internalizados por endocitosis. El pH ácido de los endosomas permite la fusión de su membrana con la del virus y el flujo de  $H^+$  a través de los canales M2 libera el RNA viral al citoplasma. La replicación y transcripción del RNA viral ocurre en el núcleo. El empacamiento y gemación de los nuevos virus ocurre a nivel de la membrana citoplasmática. Los nuevos virus están unidos a los receptores de AS por la HA y la neuraminidasa (NA) corta en enlaces específicos AS-galactosa permitiendo la liberación del virus de la célula infectada. Los inhibidores de la NA se unen a ésta inhibiéndola y evitando de este modo la liberación de virus de la célula. Figura adaptada de Moscona (2005); De Clercq (2006); Morens *et al.* (2009).

bronquios respiratorios y los alveolos. De este modo, los virus de influenza aviar H5N1 pueden causar una enfermedad severa en las vías respiratorias bajas en humanos ya que se adhieren predominantemente a los pneumocitos tipo II, los macrófagos alveolares y las células ciliadas bronquiales. Independientemente del tipo y origen del virus de influenza así como del tipo de célula blanco, sin la NA, la infección de estos virus

estaría limitada a un solo ciclo de replicación (Moscona, 2005; De Clercq, 2006; Neumann *et al.*, 2009).

Las diferentes combinaciones en los subtipos de HA y NA de los virus de influenza han generado variedades que han sido responsables de cuatro pandemias de esta enfermedad: la pandemia de 1919 o Influenza española causada por la cepa

H1N1, la de 1957 o influenza asiática causada por la cepa H2N2, la de 1968 o influenza de Hong Kong causada por la cepa H3N2 y la más reciente en el siglo XXI, la pandemia de influenza humana causada por la cepa tipo A/H1N1.

De acuerdo al origen de los virus responsables de estas cuatro pandemias de influenza, se han propuesto tres mecanismos por los cuales podría surgir una nueva variedad pandémica: **a.** por la transmisión directa de un virus (o una mutación de éste) de animales (aves) al humano y la posterior transmisión a otros humanos, tal como ocurrió en la pandemia de influenza española; **b.** a través de la recombinación de un virus de influenza aviar con un virus de influenza humana, tal y como ocurrió en la pandemia de influenza asiática y en la pandemia de Hong Kong (De Clercq, 2009; Morens *et al.*, 2009) y **c.** como resultado de una compleja serie de eventos de recombinación entre virus de influenza aviar, porcina y humana, como ocurrió recientemente con la pandemia de influenza humana en 2009 (Morens *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009). Por otro lado, la variación temporal de los tipos de HA y NA permite a los virus de influenza estacional evadir la respuesta inmune humana obligando a redefinir la formulación de nuevas vacunas cada año. Por todas estas razones, la influenza es una enfermedad que ha recibido gran atención tanto por autoridades sanitarias nacionales como internacionales (De Clercq, 2006; Neumann *et al.*, 2009).

La posibilidad de lograr inhibir la actividad de las NA virales se propuso por primera vez en la década de 1970, basándose en la habilidad de diversos análogos del AS de generar un estado de transición con la NA, sin embargo, no fue posible desarrollarlos hasta contar con modelos tridimensionales de la estructura de la NA viral que revela la ubicación y estructura de su sitio activo (Moscona, 2005; Lou, 2006). En la actualidad existen dos inhibidores de NA comercialmente disponibles, el Zanamivir (Relenza®) producido por GlaxoSmithKline y el Osetamivir (Tamiflú®) producido por Hoffman-La Roche, ambos poseen una estructura similar a la del sustrato natural de las NA, por lo que es capaz de unirse a la cavidad del sitio activo en la interacción energética más favorable. El Zanamivir posee una estructura que es parecida al AS y es administrado por inhalación, lo que libera al compuesto directamente al tracto respiratorio, mientras que el Osetamivir fue diseñado como un análogo del AS, incluyendo la adición de una cadena lipofílica lateral, que permite su administración de forma oral (Moscona, 2005; De Clercq, 2006). Ya que los inhibidores actúan como análogos del estado de transición del AS estos pueden unirse indistintamente a cualquier enlace AS-Gal (vías respiratorias superiores o inferiores).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado al Tamiflú® como el principal antiviral para planes de pandemia (Jefferson *et al.*, 2009) ya que ha sido aprobado como el único medicamento oral disponible tanto para la profilaxis como para

el tratamiento de la influenza H5N1 y recientemente para el tratamiento de influenza humana A/H1N1 tras pruebas de laboratorio en las que ha demostrado ser efectivo, disminuyendo eficaz y tempranamente los síntomas ocasionados por el virus (Liang-Deng *et al.*, 2009). Al suministrarse el Tamiflú®, el compuesto que interactúa directamente con la enzima NA es el oseltamivircoxilato, así al ser administrado el pro-fármaco como oseltamivirfosfato, éste es metabolizado y el coxilato actúa sobre las moléculas virales (Rusell *et al.*, 2006).

Actualmente el Tamiflú® es elaborado a partir del shikimato (SHK). La mejor ruta desarrollada hasta ahora a escala industrial es la empleada por la compañía farmacéutica Hoffman-La Roche y se basa principalmente en la extracción del SHK de los frutos del anís estrella chino (*Illicium verum*). La síntesis del OSF a partir del SHK consta de hasta 12 pasos, que aunados a la extracción y purificación a partir de la planta resultan en un proceso complicado, costoso y poco productivo (Liang-Deng *et al.*, 2009). A pesar de las complicaciones en su producción, los laboratorios Hoffman-La Roche tenían hasta el 2008 un nivel de producción de 400 millones de dosis al año, el cual en caso de una pandemia no sería suficiente para proveer a la población mundial (Bertelliet *al.*, 2008).

Una alternativa a la extracción del SHK de la planta de anís estrella chino, es su producción por procesos biotecnológicos utilizando cepas bacterianas modificadas genéticamente capaces de sobreproducir

este compuesto. En este contexto, y ante la amenaza de una nueva pandemia causada por una nueva variedad de virus influenza aviar o humana con una mayor letalidad, diversos gobiernos y grupos de investigación en diferentes países están trabajando en proyectos encaminados a la obtención del SHK para la producción de OSF. En esta revisión se presenta el estado actual de la aplicación de la ingeniería de vías metabólicas (IVM) a la producción de SHK en cepas de *Escherichia coli* en sistemas de fermentación.

## INGENIERÍA DE VÍAS METABÓLICAS

La IVM se puede definir como el mejoramiento de las propiedades celulares y de la capacidad de formación de un determinado producto de interés, a través de la modificación de reacciones metabólicas específicas o la introducción de nuevas mediante el uso de la tecnología del DNA recombinante (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

El punto de partida en la aplicación de la IVM para la producción de un compuesto de interés es la selección de un microorganismo con un fondo genético y fisiológico muy bien caracterizado, para entonces aplicar alguna o varias de las siguientes estrategias (Stephanopoulos & Sinskey, 1993; LaDucca *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2008):

- i. Incremento de la disponibilidad de la fuente de carbono utilizada como sustrato para la obtención de precursores destinados a la biosíntesis del producto de interés.
- ii. Incremento en la disponibilidad de los intermediarios provenientes del

catabolismo de la fuente de carbono a través del metabolismo central de carbono (MCC).

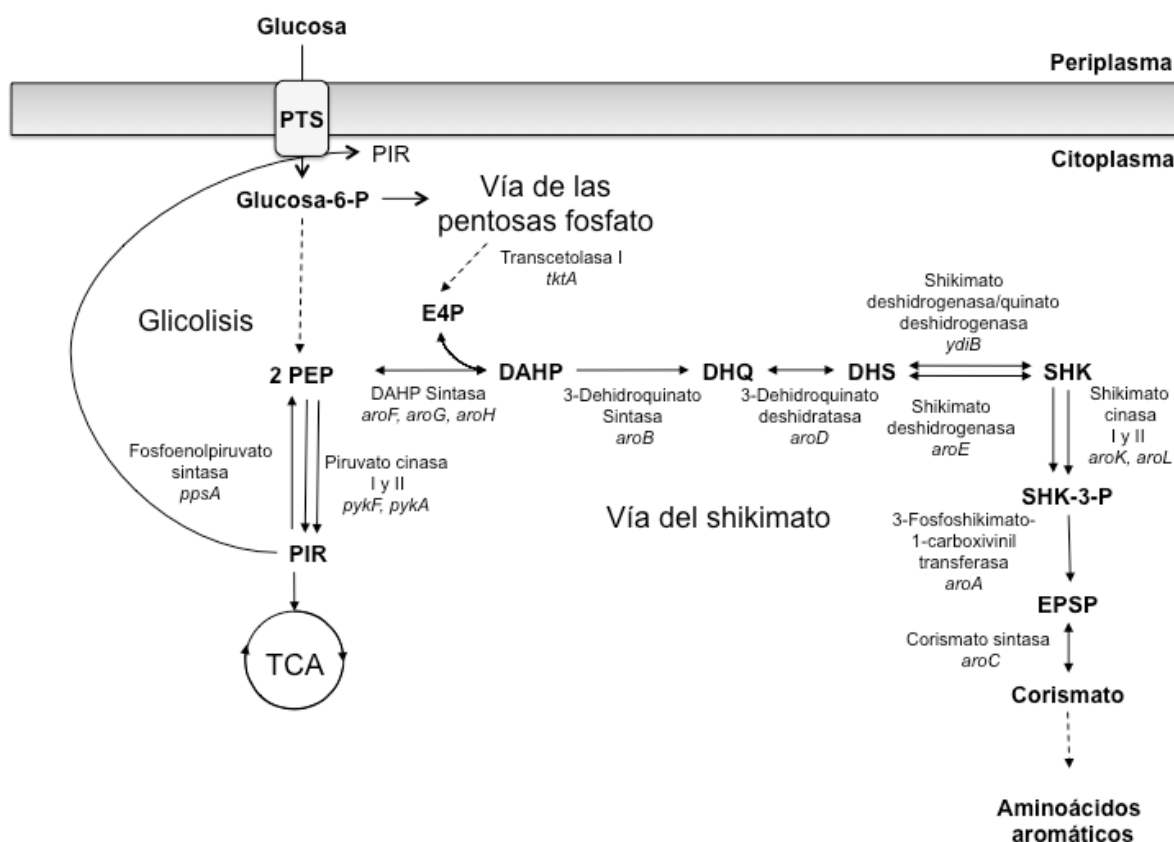
- iii. Mejoramiento de las enzimas que catalizan las reacciones que canalizan a los intermediarios del MCC a la vía de interés.
- iv. Identificación y bloqueo de la vía o vías que pudieran representar pérdida de carbono.
- v. Identificación y mejoramiento de las reacciones limitantes de la vía de interés.
- vi. Eliminación de los mecanismos de control transcripcional y alostérico de la vía.
- vii. Modulación de la expresión de genes involucrados en la vía de interés.

## **PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS EN *ESCHERICHIA COLI*: LA VÍA DEL SHIKIMATO**

La vía del SHK es la ruta metabólica por la cual se sintetiza el precursor común para la formación de aminoácidos aromáticos y otros compuestos de interés biológico. La vía se encuentra presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales. Consta de 7 pasos enzimáticos por los cuales los intermediarios del MCC, eritrosa-4-fosfato (E4P) y el fosfoenolpiruvato (PEP) (intermediarios de la vía de las pentosas

fosfato y de la glicólisis, respectivamente), son condensados y transformados para formar como producto final corismato (COR) (Figura 2). El número de enzimas implicadas varía dependiendo del organismo, sin embargo todos comparten los mismos intermediarios y producen el mismo producto final, el COR.

La primera enzima de la vía es la 3-deoxi-D-arabinoheptuloso-7-P (DAHP) sintasa (DAHPS) que condensa a la E4P y el PEP, para formar DAHP, el primer intermediario de la vía. En *E. coli* esta enzima ha sido ampliamente estudiada: posee 3 isoenzimas, AroF, AroG y AroH, codificadas respectivamente por *aroF*, *aroG* y *aroH*. La presencia de las tres isoenzimas provee a *E. coli* la capacidad de un control estricto del primer paso de la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos, permitiendo a la vez una actividad enzimática residual en presencia de un exceso de aminoácidos aromáticos que provee a la célula de precursores para la síntesis de otros compuestos aromáticos (Hudson & Davidson, 1984). Aunque estas tres isoenzimas catalizan la misma reacción, cada una de ellas es inhibida por los aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina y triptófano,



**Fig. 2.** Metabolismo central de carbono y vía de síntesis de compuestos aromáticos en *E. coli*. PTS<sup>-</sup> Sistema de fosfotransferasa de glucosa dependiente de PEP; ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Se presentan los nombres de los genes y las enzimas que codifican, respectivamente.

respectivamente. La isoenzima AroG posee al 80% de actividad de DAHPS, la AroF posee alrededor del 20%, mientras que la isoenzima AroH posee alrededor del 1% de actividad (Ray *et al.*, 1998). La segunda reacción de la vía es catalizada por la enzima dehidroquinato (DHQ) sintasa, codificada en *E. coli* por *aroB*. Esta enzima cataliza la transformación del DAHP a 3-dehidroquinato. Para llevar a cabo la reacción la enzima requiere como cofactor NAD<sup>+</sup>. La siguiente reacción de la vía es catalizada por la enzima DHQ deshidratasa, codificada en *E. coli* por *aroD*. En esta reacción, el DHQ sufre una

deshidratación obteniéndose 3-dehidroshikimato (DHS). El DHS es reducido para formar SHK. La reacción es catalizada por la enzima shikimato deshidrogenasa, codificada por *aroE* y requiere de NADPH como cofactor. En *E. coli* el SHK es convertido a shikimato-3-fosfato (SHK-3-P) por acción de las isoenzimas shikimato cinasa I y II codificadas respectivamente por *aroK* y *aroL*. Esta reacción requiere de ATP. El penúltimo paso consiste en la adición de una molécula de PEP al SHK-3-P para la obtención de 3-P-5-enolpiruvilshikimato (EPSP), reacción catalizada por la enzima

EPSP Sintasa. En *E. coli* esta enzima es codificada por *aroA*. La última reacción de la vía es catalizada por la enzima corismato sintasa, codificada por *aroC*, la cual añade un segundo doble enlace al anillo mediante la eliminación del P del EPSP dando COR como producto final (Herrmann, 1995; Herrmann & Weaver, 1999; Krämer *et al.*, 2003).

En *E. coli* se ha determinado que los genes que codifican para las enzimas DHQ sintasa (*aroB*), DHQ deshidratasa (*aroD*) y SHK deshidrogenasa (*aroE*) son expresadas de forma constitutiva mientras que la expresión de los genes que codifican a las DAHP sintasas (*aroF*, *aroG* y *aroH*) y la shikimato cinasa II (*aroL*) son regulados transcripcionalmente. Las reacciones catalizadas por las enzimas DHQ sintasa (*aroB*) y las SHK cinasas (*aroK* y *aroL*) son puntos limitantes de la vía y el SHK actúa como inhibidor por acumulación de producto final de la enzima SHK deshidrogenasa (Krämer *et al.*, 2003).

## **INGENIERÍA DE VÍAS METABÓLICAS EN *E. COLI* PARA LA PRODUCCIÓN DE SHIKIMATO**

### ***I. IVM DEL METABOLISMO CENTRAL DE CARBONO***

*E. coli* ha sido utilizada como fondo genético y fisiológico para la producción de diferentes compuestos aromáticos (LaDucca *et al.*, 1999; Baez-Viveros *et al.*, 2004; Gosset, 2005; Baez-Viveros *et al.*, 2007; Chávez-Bejar *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008; Balderas-Hernández *et al.*, 2009; Escalante *et al.*, 2010). En este contexto,

diferentes grupos de investigación se han enfocado a la modificación de diversas cepas de esta bacteria para la producción de SHK como precursor para la síntesis del antiviral OSF, aplicando los principios de la IVM para la modificación de la capacidad de transporte de glucosa como fuente de carbono para la síntesis de los precursores del MCC PEP y E4P; un incremento en la disponibilidad de éstos precursores; su canalización a la vía del SHK y la acumulación final de SHK (Chandran *et al.*, 2003; Krämer *et al.*, 2003; Escalante *et al.*, 2010). Se ha determinado que la partición del flujo de carbono en el nodo del PEP, es la principal determinante del rendimiento de compuestos aromáticos sintetizados a partir de la glucosa en *E. coli*. En esta bacteria el transporte de glucosa a partir del medio extracelular se realiza por medio de las porinas LamB y OmpCF, localizadas en la membrana externa. Una vez en el periplasma, la glucosa es internalizada por el sistema de fosfotransferasa (PTS) de glucosa dependiente de PEP (PTS:Glc:PEP), el cual transporta y fosforila simultáneamente a este azúcar, para rendir glucosa-6-P, la cual es entonces catabolizada a través del MCC para rendir los intermediarios PEP y E4P. Este sistema de transporte no depende de ATP para la fosforilación de la glucosa pero si requiere de una molécula de PEP como donadora del grupo fosfato (P), generando una molécula de piruvato (PIR) (Figura 2). Esta situación representa una desventaja desde el punto de IVM, ya que de dos moléculas de PEP que se generan del catabolismo de una molécula de glucosa que entra a la célula, un PEP es invertido para la

fosforilación de la glucosa transportada por el sistema PTS:Glc:PEP, dejando solo una molécula de PEP disponible, que junto con la E4P, son utilizados como precursores que alimentan la vía del SHK. La principal estrategia empleada para aumentar la disponibilidad de PEP ha sido la inactivación del operón *ptsHI-crr* que codifica para los componentes citoplasmáticos del sistema PTS y que son los responsables de la transferencia del P del PEP al componente de membrana de este sistema involucrado en la traslocación de la glucosa, resultando en cepas con un fenotipo PTS<sup>-</sup> que exhiben una afectación negativa en su capacidad de crecer en glucosa, pero con la disponibilidad de 2 moléculas de PEP (Flores *et al.*, 1996; LaDucca *et al.*, 1999; Gosset, 2005; Flores *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2007).

Las cepas PTS<sup>-</sup> poseen una capacidad muy limitada para transportar glucosa por sistemas alternativos al PTS:glucosa:PEP, como son la permeasa de galactosa (GalP) o el sistema transportador de galactosa MglABC. Para mejorar su capacidad de crecer en glucosa se han desarrollado diversas estrategias como son el crecimiento en sistemas de quimiostato a diferentes tasas de alimentación de glucosa y la selección a diferentes tiempos de cultivo de mutantes que han recuperado su capacidad de crecer en este azúcar. Flores *et al.*, (1996; 2007), reportan la inactivación del sistema PTS en la cepa de *E. coli* JM101 por remplazo del operón *ptsHI-crr* con un gen que confiere resistencia a kanamicina. La cepa PTS<sup>-</sup> resultante (PB11) redujo su velocidad

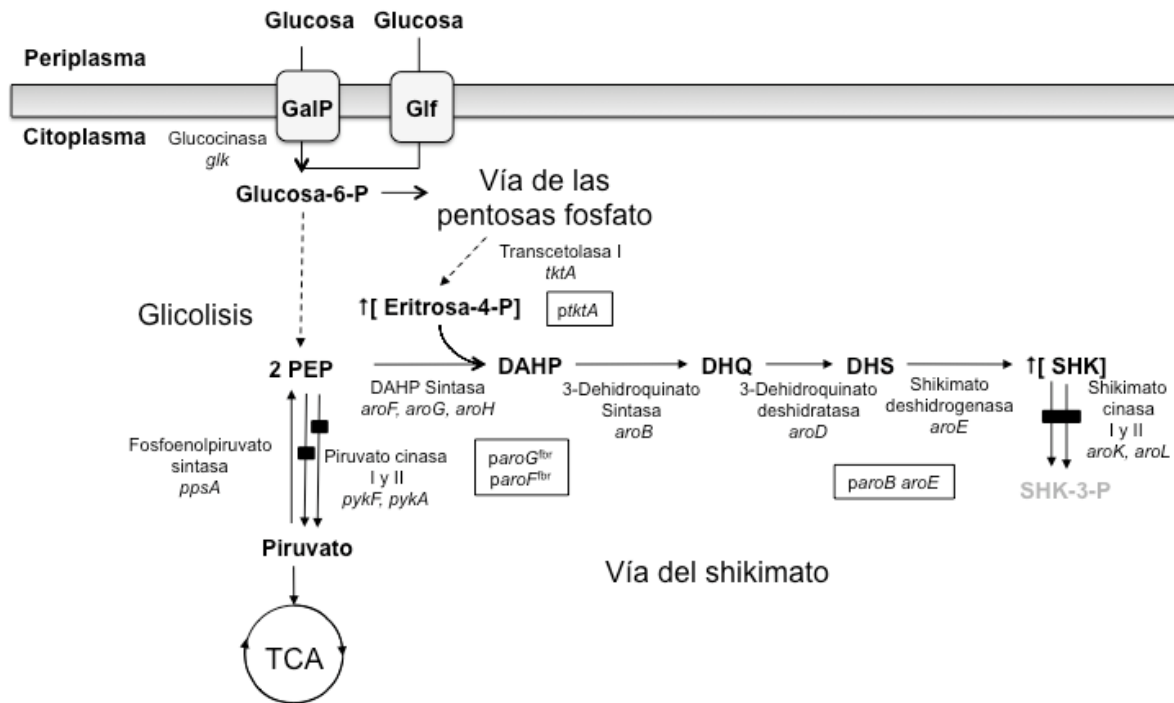
específica de crecimiento ( $\mu$ ) en medio mínimo M9 de  $0.7 \text{ h}^{-1}$  (cepa JM101) a  $0.1 \text{ h}^{-1}$ . Al crecer esta mutante PTS<sup>-</sup> en quimiostato se aislaron cepas derivadas que incrementaron su capacidad de crecer en glucosa. De este modo se obtuvo una cepa denominada PB12 que incrementó su  $\mu$  a  $0.4 \text{ h}^{-1}$  (Flores *et al.*, 1996; 2007) El análisis posterior de esta cepa permitió establecer que la glucosa es transportada principalmente por el sistema GalP y fosforilada por una glucocinasa para rendir glucosa-6-P. El análisis transcriptómico de esta cepa mostró un nivel de expresión de *galP* 13.1 veces mayor al de la cepa parental JM101 (Flores *et al.*, 2005). La inactivación del sistema PTS en la cepa de *E. coli* denominada VH32 (derivada de la cepa W3110) y la expresión de *galP* bajo control del promotor fuerte *trc* demostró también ser de gran utilidad para incrementar el transporte de glucosa, mejorando de manera importante la velocidad específica de crecimiento con respecto a la cepa parental. El análisis de las cepas PTS<sup>-</sup>glc<sup>+</sup> PB12 y VH32 en sistemas de fermentación ha demostrado que producen una baja o nula concentración de ácido acético, aún en concentraciones iniciales elevadas de glucosa, lo que representa una gran ventaja para su uso como fondos genéticos y fisiológicos para la posterior aplicación de otras estrategias de IVM encaminadas a la sobreproducción de proteínas recombinantes y metabolitos de interés (Hernández-Montalvo *et al.*, 2003; De Anda *et al.*, 2006, Lara *et al.*, 2006; Balderas *et al.*, 2009). La

expresión heteróloga de sistemas de transporte y fosforilación de glucosa no dependientes de PEP como el facilitador de glucosa (Glf) de *Zymomonas mobilis*, codificado por *glf* acoplado a la actividad de la glucocinasa (*glk*) de *Z. mobilis* se ha utilizado también como una alternativa para restaurar la capacidad de transporte y fosforilación de glucosa en la cepa de *E. coli* PTS<sup>-</sup> Sp1.1 (Chandran *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2003).

La inactivación del sistema PTS:Glu:PEP en diferentes fondos genéticos de *E. coli* ha demostrado tener un impacto importante en la disponibilidad de PEP, tal y como se describió previamente, sin embargo, diversos autores han incrementado la disponibilidad de PEP utilizando otras estrategias como la sobreexpresión de *ppsA*, que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato sintasa permite reciclar el PIR a PEP (Chandran *et al.*, 2003), mientras que también se ha evaluado la inactivación de una o ambas de las enzimas de las piruvato cinasas I y II codificadas por *pykF* y *pykA*, respectivamente, y que son responsables de la transformación de PEP a PIR (Gosset *et al.*, 1996; LaDucca *et al.*, 1999; Escalante *et al.*, 2009) (Figura 3). Se ha determinado que el solo incremento en la disponibilidad de PEP no es suficiente para incrementar el flujo de carbono hacia la vía del SHK y que se requiere, de forma

concomitante, de una mayor disponibilidad del E4P para asegurar una máxima actividad de la DAHP sintasa. Para este fin se ha incrementado la disponibilidad de este compuesto como resultado de la sobreexpresión del gen *tktA* que codifica para la enzima transcetolasa I (LaDucca *et al.*, 1999; Baez-Viveros *et al.*, 2004; Gosset *et al.*, 2005; Baez-Viveros *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2008; Balderas-Hernández *et al.*, 2009).

La inhibición por acumulación de producto que presentan en *E. coli* las isoenzimas AroFGH por los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano, respectivamente, representa un problema, muy importante en la producción de compuestos aromáticos, por lo que se han desarrollado y clonado en plásmido versiones insensibles a inhibición de *aroG* y *aroF* (*aroG<sup>fbr</sup>* y *aroF<sup>fbr</sup>*, fbr, feedback resistant, por sus siglas en inglés) (Chandran *et al.*, 2003; Escalante *et al.*, 2010). La inactivación del sistema PTS:Glc:PEP, junto con la sobreexpresión de *tktA* y *aroG<sup>fbr</sup>*, la inactivación del flujo de PEP a PIR por inactivación de las enzimas piruvato cinasa I y/o II en combinación con la sobreexpresión de *ppsA* ha permitido un incremento en el flujo de carbono hacia la vía de síntesis de compuestos aromáticos en algunas cepas de *E. coli* de hasta 20X (LaDucca *et al.*, 1999).



**Fig. 3.** Ingeniería de vías metabólicas en cepas de *E. coli* PTS<sup>-</sup> para la sobreproducción de shikimato en sistemas de fermentación. Permeasa de galactosa (GalP), facilitador de glucosa de *Z. mobilis* (Gif), ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Se presentan los nombres de los genes y las enzimas que codifican, respectivamente. *ptkA*, *paroG<sup>fbr</sup>*, *paroF<sup>fbr</sup>*, *paroB aroE*, denotan la clonación de estos genes en diversos plásmidos. —, simboliza la interrupción de uno o varios genes. ↑ [ ], simboliza un incremento en la concentración del metabolito en cuestión. Las flechas continuas representan reacciones catalizadas por una sola enzima o isoenzimas. Las flechas punteadas representan diversas reacciones enzimáticas. Figura adaptada a partir de Chandran *et al.* (2003); Kramer *et al.* (2003); Johansson & Lidén (2006); Escalante *et al.* (2010).

## II. INGENIERÍA DE VÍAS METABÓLICAS DE LA VÍA DEL SHIKIMATO

Algunas de las modificaciones del MCC descritas en la sección anterior han sido aplicadas de forma exitosa en diversas cepas de *E. coli* utilizadas como fondos genéticos para la producción de SHK (Chandran *et al.*, 2003; Krämer *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2005; Escalante *et al.*, 2010), en combinación con algunas de las siguientes modificaciones realizadas en la vía del SHK (Tabla 1):

- i) Interrupción de la vía del SHK por inactivación de los genes *aroK* y *aroL*.

Con el fin de bloquear el flujo de SHK a SHK-3-P, se ha interrumpido la vía de forma parcial al inactivar *aroL* y mantener funcional a *aroK*, que codifican respectivamente para las enzimas de la shikimato cinasa I y II. La inactivación de *aroL* es una estrategia que permite la posibilidad de que *E. coli* pueda continuar sintetizando sus propios aminoácidos aromáticos y no requerir de la adición en el medio para satisfacer la auxotrofía generada por la doble inactivación de estas enzimas

# ARTÍCULO DE REVISIÓN

(Johansson *et al.*, 2005). Sin embargo, esta estrategia resulta en una baja producción de SHK utilizando medio mineral suplementado con glucosa (Johansson *et al.*, 2005) o bien medio mineral suplementado con glucosa y extracto de levadura (Escalante *et al.*, 2010), resultado que confirma el papel secundario propuesto para la enzima SHK cinasa I. La doble interrupción de *aroK* y *aroL*, tiene como resultado el bloqueo total de la vía y un incremento considerable en la acumulación de SHK aunque se genera una auxotrofia triple (Figura 3) (Chandran *et al.*, 2003; Krämer *et al.*, 2003; Escalante *et al.*, 2010).

ii) Eliminación de las reacciones limitantes de la vía.

Como se describió previamente, en la vía del SHK las reacciones catalizadas por las enzimas DHQ sintasa y SHK sintasa que son codificadas por *aroB* y *aroE* respectivamente, son consideradas como los puntos limitantes de la vía, generando una acumulación de los intermediarios DAHP y DHS. Para contener con esta situación se ha clonado en plásmidos una copia adicional de los genes *aroB* y *aroE*, teniendo como resultado un incremento importante en la producción de SHK y una disminución en la concentración de los intermediarios DAHP y DHS (Tabla 1, Figura 3) (Chandran *et al.*, 2003; Escalante *et al.*, 2010).

**Tabla 1.** Producción y rendimientos de shikimato en cepas de *Escherichia coli*.

Cepa productora	Características	Producción (g SA/L)	Rendimiento (mol SA/mol glc)	Referencia
SP1.1/pKD12.138	<i>serA::aroB ΔaroL</i> <i>ΔaroK pSU18 aroF<sup>obr</sup></i> <i>Ptac aroE serA tktA</i>	52.00 <sup>a,e</sup>	0.180	Knop <i>et al.</i> (2001)
SP1.1pts/pSC6.090B	<i>serA::aroB ΔaroL</i> <i>ΔaroK PTS<sup>-</sup> Ptac glf</i> <i>glk, aroF<sup>obr</sup>, tktA, Ptac</i> <i>aroE, serA</i>	71.00 <sup>b,e</sup>	0.270	Chandran <i>et al.</i> (2003)
W3110.shik1	<i>ΔaroL aroG<sup>obr</sup> trpE<sup>obr</sup></i> <i>pSGs26 aroF<sup>obr</sup></i>	6.85 <sup>c,1</sup>	0.059	Johansson <i>et al.</i> (2005)
PB12.SA22	<i>PTS<sup>-</sup> ΔaroL ΔaroK</i> <i>pJLB aroG<sup>obr</sup> tktA</i> <i>pTOPO aroB aroE</i>	7.05 <sup>d,e</sup>	0.290	Escalante <i>et al.</i> (2010)

<sup>a, b</sup> Cultivo en lote alimentado con 1 L de volumen de trabajo. <sup>c</sup> Cultivos en quimiostato en reactores de 3.5 L de capacidad. <sup>d</sup> Cultivo en lote con 0.5 L de volumen de trabajo. <sup>e</sup> Medio mineral base suplementado con 25 g/L de glucosa y 15 g/L de extracto de levadura. <sup>1</sup> Medio mineral base con limitación de fosfatos y concentración inicial de glucosa de 20 g/L, con una tasa de alimentación de 5 g/L al momento de agotarse el fosfato.

- ii) Interrupción del equilibrio hidroaromático en la vía del SHK y disminución en la formación de otros productos no deseados.

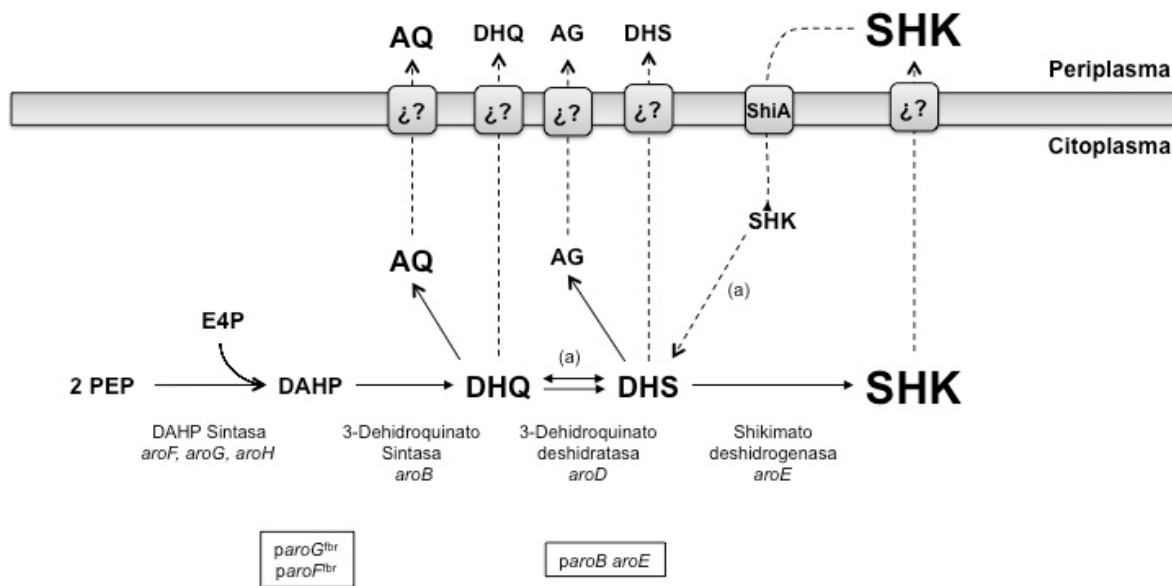
Se ha propuesto que en cepas de *E. coli* sobreproductoras de SHK, éste compuesto se acumula como consecuencia de dos posibles mecanismos: (a) La acumulación extracelular de SHK favorece su introducción a la célula a través de transportadores como ShiA, codificado por *shiA*, o bien, (b) como resultado de una posible deficiencia en el exporte de SHK al medio (a la fecha no se conocen los sistemas de excreción de SHK y otros compuestos intermediarios y co-productos de la vía común de aromáticos) (Knop *et al.*, 2001; Chandran *et al.*, 2003; Krämer, *et al.*, 2003; Johanson & Lidén, 2005; ). Esta situación puede provocar una inversión en la dirección de las reacciones de  $DHQ \rightarrow DHS \rightarrow SHK$ . En la dirección de síntesis de DHQ a SHK, las reacciones son catalizadas por las enzimas dehidroquinato sintasa y SHK deshidrogenasa respectivamente, mientras que el flujo de SHK a DHQ es catalizado únicamente por la enzima quinato/SHK deshidrogenasa codificada por *ydiB*, resultando en la acumulación de DHS y DHQ con la subsecuente síntesis de otros compuestos como el AQ (a partir de DHQ) o el ácido gálico (AG) a

partir de DHS, que junto con sus precursores son excretados también al medio de cultivo y que son considerados como contaminantes en sistemas de producción (Figura 4). Se ha reportado la coproducción de hasta 4.4 g/L de DHS, 12.6 g/L de AQ con la producción de 27 g/L de SHK (Krämer *et al.*, 2003).

La formación de estos productos y particularmente el AQ, afecta de forma importante el proceso de recuperación y purificación de SHK (Krämer *et al.*, 2003). Para resolver este problema, de forma adicional a la clonación de una copia de *aroB* y *aroE* en plásmido, se han desarrollado algunas estrategias de fermentación para evitar la formación del equilibrio hidroaromático, tales como son el cultivo en sistemas de fermentación en lote alimentado con un exceso en la cantidad de glucosa alimentada (50-170 mM) resultando en la coproducción de 5 g/L de AQ por 70 g/L de SHK (Chandran *et al.*, 2003) o bien el desarrollo de cultivos en quimiostato con limitación de fosfatos, reportándose la ausencia de AQ bajo esta condición (Johansson & Lidén, 2006).

## CONCLUSIONES

La producción de SHK por vía microbiana en sistemas de fermentación ha permitido la obtención de este compuesto de forma abundante y con pureza requerida para ser utilizado como precursor para la síntesis de



**Fig. 4.** Mecanismo propuesto para la formación del equilibrio hidroaromático en cepas de *E. coli* sobreproductoras de SHK. Las líneas punteadas presentan probables mecanismos de transporte.  $paroG^{fbr}$ ,  $paroF^{fbr}$ ,  $paroB$   $aroE$  denotan la clonación de estos genes en diversos plásmidos. La diferencia en el tamaño del nombre de los compuestos denota nivel de concentración. Se presentan los nombres de los genes y las enzimas que codifican, respectivamente. (a) Quinato/SHK deshidrogenasa codificada por *ydiB*. Figura adaptada a partir de Knop *et al.* (2001); Krämer *et al.* (2003); Johansson & Lidén (2006).

inhibidores de la NA de virus de influenza estacionaria, de influenza pandémica humana y de virus de influenza aviar con potencial pandémico. Aunque se han aplicado con éxito diversas estrategias de IVM sobre el MCC y la vía del SHK en varios fondos genéticos de *E. coli* y se han evaluado en diferentes sistemas de fermentación (lote, lote alimentado y quimiostato), existen diversos aspectos que deben de ser atendidos con la finalidad de mejorar la producción y rendimiento de SHK, entre los que se destacan: (i) Incrementar la disponibilidad de los precursores del MCC PEP y E4P hacia la producción de SHK en cepas sobreproductoras, ya que aunque el mejor rendimiento reportado es de 0.29 mol

SHK/mol de glucosa, el rendimiento teórico máximo es de 0.86 (mol/mol); (ii) La posibilidad de utilizar en sistemas de fermentación cepas sin plásmidos para minimizar el efecto de carga metabólica sobre el crecimiento y producción de SHK, mediante la inserción en cromosoma de copias adicionales de los genes clonados como  $aroG^{fbr}$ ,  $aroF^{fbr}$ ,  $aroB$  y  $aroE$  bajo promotores fuertes o susceptibles de ser modulados; (iii) Minimizar la formación de compuestos aromáticos como el AQ y la acumulación de DHS, que afectan el rendimiento del SHK en sistemas de fermentación e interfieren con el proceso de extracción a partir de caldos de fermentación libres de células y (iv) Profundizar en el

conocimiento transcriptómico, proteómico y fluxómico de estas cepas en medios y condiciones de producción, lo que permitirá contar con mayores elementos para diseñar y redirigir nuevas estrategias de IVM para mejorar la capacidad de producción de este compuesto.

La influenza es una enfermedad que continuará estando presente en la vida cotidiana del hombre y a pesar de contar con compuestos antivirales y vacunas para su prevención y tratamiento, las características biológicas de estos virus hacen que exista la posibilidad permanente de brotes causados por nuevos virus de influenza con el riesgo real de convertirse en una nueva pandemia, por lo que resulta de gran importancia aumentar la disponibilidad de precursores para la síntesis de antivirales derivados del SHK. Por otro lado, la posibilidad del surgimiento de cepas mutantes de virus resistentes a los antivirales existentes en la actualidad requieren del desarrollo de nuevos antivirales que sean susceptibles de ser producidos también por vía microbiana en sistemas de fermentación.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por CONACYT proyectos 105782, 126793 y DGAPA-UNAM proyecto PAPIIT IN224709.

## REFERENCIAS

Baez-Viveros JL, Osuna J, Hernandez-Chavez G, Soberon X, Bolivar F & Gosset G (2004) Metabolic engineering and protein directed evolution increase

the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 87:516-524.

Baez-Viveros JL, Flores N, Juarez K, Castillo-Espana P, Bolivar F & Gosset G (2007) Metabolic transcription analysis of engineered *Escherichia coli* strains that overproduce L-phenylalanine. *Microb. Cell. Fact.* 6:1-20.

Balderas-Hernández VE, Sabido-Ramos A, Silva P, Cabrera-Valladares N, Hernández-Chávez G, Báez-Viveros JL, Martínez A, Bolívar F & Gosset G (2009) Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*. *Microb. Cell. Fact.* 8:19.

Bertelli AAE, Mannari C, Santi S, Filippi C, Migliori M & Giovannini L (2008) Immunomodulatory activity of shikimic acid and quercetin in comparison with oseltamivir (Tamiflu) in a "in vitro" model. *J. Med. Virol.* 80:741-745.

Chandran SS, YiJ, Draths KM, von Daeniken R, Weber W & Frost JW (2003) Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnol. Progr.* 19:808-804

Chávez-Bejar MI, Lara AR, Lopez H, Hernandez-Chavez G, Martinez A, Ramirez OT, Bolivar F & Gosset G (2008) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-tyrosine production by expression of genes coding for the chorismate mutase domain of the native chorismate mutase prephenate dehydratase and a cyclohexadienyl dehydrogenase from *Zymomonas*

- mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3284-3290.
- De Anda R, Lara AR, Hernández-Montalvo V, Gosset G, Bolivar F & Ramirez OT (2006) Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metab. Eng.* 8:281-290.
- De Clercq E (2006) Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat. Rev. Drug. Disc.* 5:1015-1025.
- Escalante A, Valdivia A, Gosset G & Bolívar F (2009) Ingeniería de Vías metabólicas en *Escherichia coli* PTS- para la obtención de cepas sobreproductoras de shikimato. *Mens. Bioquim.* 13:171-180.
- Escalante A, Calderón R, Valdivia A, De Anda R, Hernández G, Ramírez OT, Gosset G & Bolívar F (2010) Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microb. Cell. Fact.* 9:1-12.
- Flores N, Leal L, Sigala JC, de Anda R, Escalante A, Martínez A, Ramirez OT, Gosset G & Bolivar F (2007) Growth recovery on glucose under aerobic conditions of an *Escherichia coli* strain carrying a phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system deletion by inactivating *arcA* and overexpressing the genes coding for glucokinase and galactose permease. *J. Mol. Microb. Biotechnol.* 13:105-116.
- Flores N, Xiao J, Berry A, Bolivar F & Valle F (1996) Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 14:620-623.
- Flores N, Flores A, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G. & Bolivar F (2005) Adaptation for fast growth by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metab. Eng.* 7:70-87
- Flores S, Flores N, de Anda R, Gonzalez A, Escalante A, Sigala JC, Gosset G & Bolivar F (2005) Nutrient-scavenging stress response in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system, as explored by gene expression profile analysis. *J. Mol. Microb. Biotechnol.* 10:51-63.
- Gosset G, Yong-Xiao J & Berry A (1996) A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* 17:47-52.
- Gosset G (2005) Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microb. Cell. Fact.* 4:14.
- Hernández-Montalvo V, Martínez A, Hernandez-Chavez G, Bolívar F, Valle F & Gosset G (2003) Expression of *galP*

- and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnol. Bioeng.* 83:687-694.
- Herrmann KM (1995) The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiol.* 107:7-12.
- Herrmann KM & Weaver LM (1999) The shikimate pathway. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 50:473-503.
- Hudson GS & Davidson BE (1984) Nucleotide sequence and transcription of the phenylalanine and tyrosine operons of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Microbiol.* 180:1023-1051.
- Jefferson T, Jones M, Doshi P & Del Mar C (2009) Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults: systematic review and meta-analysis. *Brit. Med. J.* 339:b5106
- Johansson L, Lindskog A, Silfversparre G, Cimander C, Nielsen KF & Lidén G (2005) Shikimic acid production by a modified strain of *E. coli* (W3110.shik1) under phosphate-limited and carbon-limited conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 92:541-552.
- Johansson L & Lidén G (2006) Transcriptome analysis of a shikimic acid producing strain of *Escherichia coli* W3110 grown under carbon- and phosphate-limited conditions. *J. Biotechnol.* 126:528-545.
- Knop DR, Draths KM, Chandran SS, Barker JL & Frost JW (2001) Hydroaromatic equilibrium during biosynthesis of shikimic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 123:10173-10182.
- Krämer M, Bongaerts J, Bovenberg R, Kremer S, Muller U, Orf S, Wubbolts M & Raeven L (2003) Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metab. Eng.* 5:277-283.
- LaDuca RJ, Berry A, Chotani G, Dodge TC, Gosset G, Valle F, Liao JC, Yong-Xiao J & Power SD (1999) Metabolic pathway engineering of aromatic compounds. In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2nd Ed. Demain AL and David JE (ed). ASM Press, Washington, D. C. pp 605-615.
- Lara AR, Vazquez-Limon C, Gosset G, Bolivar F, Lopez-Munguia A & Ramirez OT (2006) Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and reduce formation of by-products during recombinant protein production under transient intermittent anaerobic conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 94:1164-1175.
- Lee S, Kim H, Park J, Park J & Kim T (2008) Metabolic engineering of microorganisms: general strategies and drug production. *Drug. Discov. Today.* 14:78-88.
- Liang-Deng N, Xiao-Xin S, Kwang H & Wei-Dong L (2009) A short and practical synthesis of oseltamivir phosphate (Tamiflu) from (-)-shikimic acid. *J. Org. Chem.* 74:3970-3973.
- Luo M (2006) Antiviral drugs fit for a purpose. *Nature.* 443:37-38.
- Martinez K, de Anda R, Hernandez G, Escalante A, Gosset G, Ramirez OT & Bolivar F (2008) Couitilization of glucose and glycerol enhances the production of

- aromatic compounds in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microb. Cell. Fac.* 7:1-12.
- Morens DM, Taubenberg JK & Fauci AS (2009) The persistent legacy of the 1918 influenza virus. *New. Engl. J. Med.* 361: 225-229.
- Moscona A (2005) Drug therapy. Neuraminidase Inhibitors for Influenza. *New. Engl. J. Med.* 353:1363-1373.
- Neumann G, Noda T & Kawaoka Y (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature.* 459:931-9139.
- Ray J M, Yanofsky C & Bauerle R (1998) Mutational analysis of the catalytic and feedback sites of the tryptophan-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 5500-5506.
- Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ, Collings PJ, Lin YP, Blackburn M, Hay AJ, Gamblin SJ & Skehel JJ (2006) The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature.* 443: 45-49.
- Stephanopoulos G & Sinskey A (1993) Metabolic engineering-methodologies and future prospects. *Trends Biotechnol.* 11: 392-396.
- Stephanopoulos G, Aristidou A & Nielsen J (1998) The essence of metabolic engineering. *In:* Stephanopoulos G, Aristidou A & Nielsen J (ed). Metabolic engineering: principles and methodologies. Academic. Press, San Diego, California. pp 1-20.
- Yi J, Draths KM, Li K & Frost JW (2003) Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol. Progr.* 19: 1450–1459

## INFORME FINAL DE LA MESA DIRECTIVA NACIONAL 2008-2010 DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

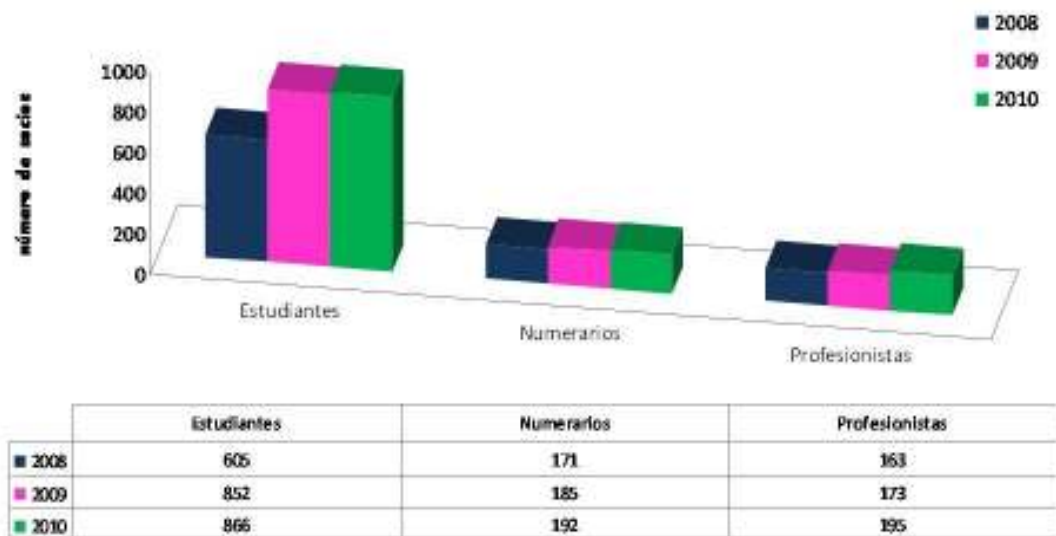
**Dra. María Luisa Villarreal Ortega**

En el período que tengo el honor de informar y que fue preparado por los integrantes de la Mesa Directiva Nacional (MDN) 2008-2010, las actividades estuvieron dirigidas alrededor de varios ejes principales de acción, que a continuación voy a referir

### IMPULSO A LA MEMBRESIA

Una de las preocupaciones constantes de las mesas directivas nacionales de la SMBB, ha sido el mantener, y preferentemente incrementar, el tamaño de la membresía. Al

día de hoy, me es grato informarles que la SMBB cuenta con un total de 1,253 socios, de los cuales el 15% son numerarios y el 16 % profesionales; en tanto que el 69% de los socios son estudiantes. Esto último pone una vez más de manifiesto el gran interés del sector estudiantil por pertenecer a la sociedad. En la Fig. 1 se muestra el crecimiento de la membresía en los últimos tres años, donde es posible señalar que para el bienio 2008-2010 ésta aumentó en casi un 26%.

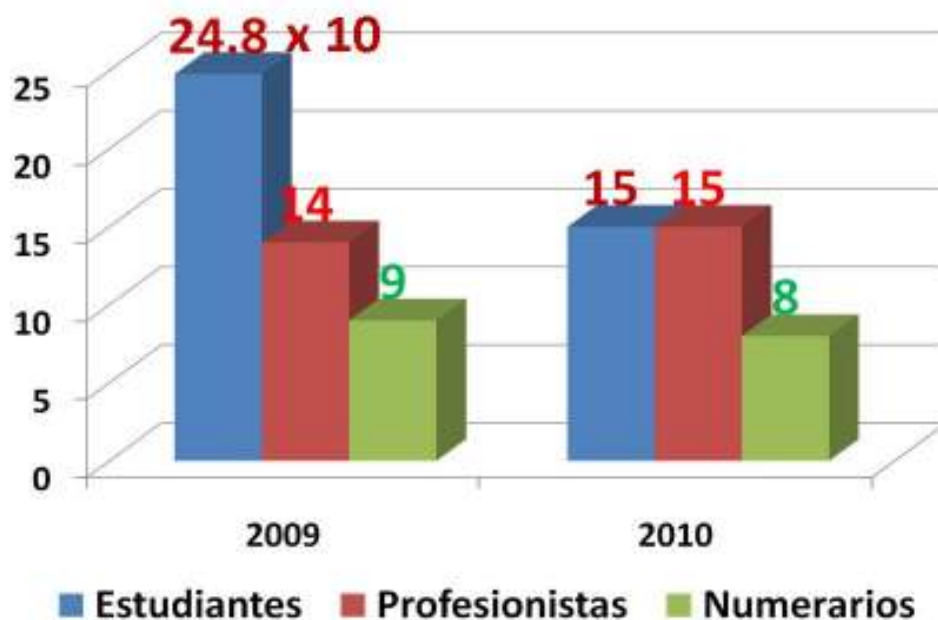


**Figura 1** Membresía de la SMBB, durante los años 2008,2009 y 2010, por categoría de los socios.

# INFORME FINAL MDN 2008-2010

En la Fig. 2 se explica la distribución de los nuevos socios por categoría durante el año 2009 (año de congreso) y lo que transcurrió del año 2010. Estos datos

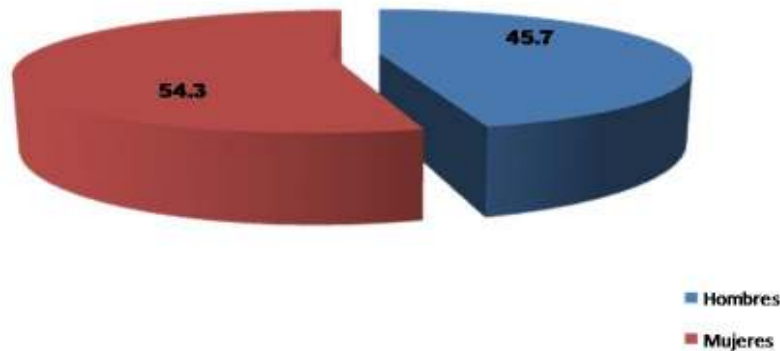
reflejan, lo que siempre ha ocurrido, que en el año de congreso se registra un mayor ingreso a la Sociedad



**Figura 2.** Incorporación de nuevos socios a la SMBB en 2009 (271) y en los meses transcurridos (enero-septiembre) de 2010 (38)

Otro dato interesante, se refiere a la distribución de la membresía por género. Actualmente el 45.7% de los socios son

hombres, en tanto que el 54.3 % está integrado por mujeres (Fig. 3)



**Figura 3.** Porcentaje de socios de la SMBB distribuidos por género.

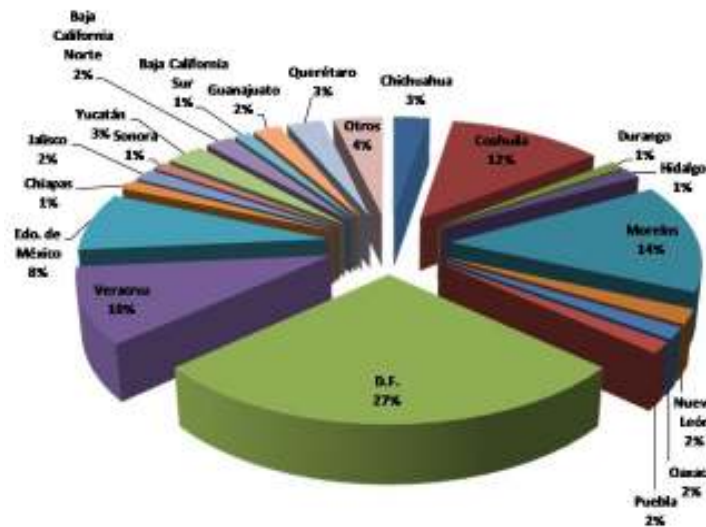
Aprovecho la ocasión para hacer patente nuestro reconocimiento a la Comisión de Membresía por su dedicación y esmero en la revisión y aceptación de nuevos socios. Esta comisión estuvo integrada por los doctores Cristóbal Noé Aguilar, Alejandro Azaola Espinosa, Liliana Alamilla Beltrán y María de Lourdes Escamilla Hurtado; y coordinada por el vicepresidente de la sociedad, Dr. Alfredo Martínez Jiménez.

desempeño de las delegaciones de Coahuila, Morelos y Yucatán sobresalen, a que realizan diversas actividades académicas, como son congresos regionales, cursos y conferencias cenas, eventos en los que la MDN siempre ha tenido presencia. Cabe mencionar que es probable que una nueva delegación del estado de Puebla esté próxima a constituirse, debido al interés que han venido mostrando los socios de esa localidad.

### APOYO A LAS DELEGACIONES

La SMBB cuenta actualmente con 11 delegaciones regionales. De todas ellas, el

Por otro lado, en la Figura 4 se presenta la distribución de los socios de la SMBB a lo largo de la República Mexicana



**Figura 4.** Distribución de los socios de la SMBB en México

## APOYO A PUBLICACIONES

Las publicaciones periódicas de la Sociedad se han mantenido en sus emisiones regulares. El Biotlahuica, Boletín Informativo de la Delegación Morelos ha mantenido 4 emisiones anuales; y gracias a la esmerada labor de su única editora actual, la Dra. Oledad Córdova, se distribuye en forma electrónica a partir del año 2007.

Así también, la revista BioTecnología, la publicación regular que brinda prestigio a la Sociedad, ha mantenido sus emisiones cuatrimestrales en la página electrónica. Un reconocimiento especial al trabajo experto del Dr. Sergio Sánchez Esquivel editor de la revista, así como al comité editorial integrado por los doctores: Luis Bernardo Flores, Fernando García Carreño, Mariano Gutiérrez, Romina Rodríguez y Sara Solís. La labor detallada y cuidadosa de este comité en la edición de los artículos ha permitido que la revista se mantenga en los niveles de excelencia en que la conocemos actualmente. La revista se encuentra incluida en PERIODICA, que es un índice de revistas latinoamericanas en ciencia

## OTORGAMIENTO DE PREMIOS

Una de las actividades prioritarias de la Sociedad, ha sido el otorgamiento de premios para reconocer y estimular la labor de jóvenes sobresalientes trabajando en instituciones mexicanas en las áreas de Biotecnología y Bioingeniería. Estos premios se han convertido en referentes de excelencia en el ámbito científico y académico

Tradicionalmente la SMBB otorga tres premios importantes que son el Premio Sergio Sánchez Esquivel (a los mejores protocolos de tesis de licenciatura, maestría y doctorado) el premio Alfredo Sánchez Marroquín, que desde 1999 se otorga a las mejores tesis de licenciatura, maestría y doctorado; y el premio Carlos Casas Campillo, que desde 1996 se ha venido otorgando a jóvenes biotecnólogos distinguidos gracias al generoso patrocinio de Yakult.

En este bienio, la Comisión de Premios estuvo constituida por los doctores Rafael Vázquez, Amanda Gálvez, Gabriela Sepúlveda y Carlos Regalado, y presidida por la Dra. Ana Ramos Valdivia, subsecretaria de la MDN. A todos ellos

agradecemos su tiempo y dedicación en la lectura de muchos manuscritos, y en la selección imparcial de los premiados.

Para el Premio Sergio Sánchez Esquivel 2008, patrocinado por Thermo Fisher Scientific – HyClone, Research Serum & Media Inc. (E.U.A.) y su representante en México Química Valaner, se revisaron expedientes de 6 estudiantes de doctorado, 6 de maestría, 1 de especialidad y 1 de licenciatura; y se seleccionaron los protocolos de Susana Flores Villalva (maestría) y William Alfonso Rodríguez Limas (doctorado). La entrega de estos premios se realizó en el 3er Congreso Internacional de Alimentos celebrado en Querétaro.

En el caso del Premio Alfredo Sánchez Marroquín 2009, la Comisión evaluó 11 tesis de licenciatura, 26 de maestría y 9 de doctorado, designando como ganadora por la mejor tesis de licenciatura a la Q.F.B. Rocío Zapata Bustos, de maestría a la M. en C. Mabel Rodríguez González y como mejor tesis de doctorado, el jurado eligió a la de la Dra. María del Pilar Escalante Minakata. El premio se entregó en el X111 Congreso Nacional de la SMBB.

En relación al Premio Carlos Casas Campillo 2010 que igualmente es patrocinado por Yakult, los ganadores fueron los doctores Francisco Barona e Isabel Gómez Gómez quienes recibieron un premio compartido, y que fueron seleccionados de entre 8 candidatos.

En este bienio, la MDN y el Comité de Expresidentes de la SMBB tomó la iniciativa de instituir un nuevo premio para honrar a socios distinguidos que han sido pilar fundamental para el desarrollo de la ciencia, la tecnología y las políticas que sustentan a la biotecnología y la bioingeniería en México. Es por ello que, con la aprobación del Comité Asesor de Expresidentes coordinado por el Dr. Mariano García Garibay, se instituyó, a partir de 2009 la distinción "Miembro de Honor". En su primera edición y por unanimidad de votos se otorgó la distinción al Dr. Fernando Esparza García del CINVESTAV-Zacatenco, como un reconocimiento a sus aportaciones a la biotecnología y bioingeniería nacional, a la calidad académica y humana que lo han

distinguido, y a su dedicación a la formación de muchas generaciones de estudiantes.

Agradecemos a nuestros expresidentes el habernos brindarnos su experiencia en la elaboración de los lineamientos.

## **PAGINA WEB DE LA SOCIEDAD**

La reestructuración de la página WEB de la SMBB es uno de los logros que consideramos más importantes durante este bienio, y del que estamos más complacidos. En ese sentido, deseamos expresar nuestro reconocimiento más profundo a la Lic. Nayeli Quinto, por su labor impecable, su esmero, y su buen ánimo para lograr que la página cuente con la calidad actual.

La nueva página se inauguró el 7 de enero de 2009 y entre otros beneficios importantes que nos ha proporcionado, cabe mencionar que a través de ella se logró la implementación de un nuevo sistema de recepción en línea de resúmenes del congreso, lo que permitió un registro eficiente por parte de los autores y facilitó la evaluación y el envío de resultados. Esta tarea anteriormente se realizaba con suma dificultad, y actualmente el nuevo sistema ha quedado como una plataforma de trabajo para congresos subsecuentes.

Otro de los rubros a los que se dedicó mucho esfuerzo en la página web, ha sido la inclusión de resúmenes de los trabajos presentados en los últimos cinco congresos. Esta información poco a poco se está actualizando, y en un corto tiempo permitirá una visibilidad permanente de los trabajos realizados por los socios durante los congresos nacionales.

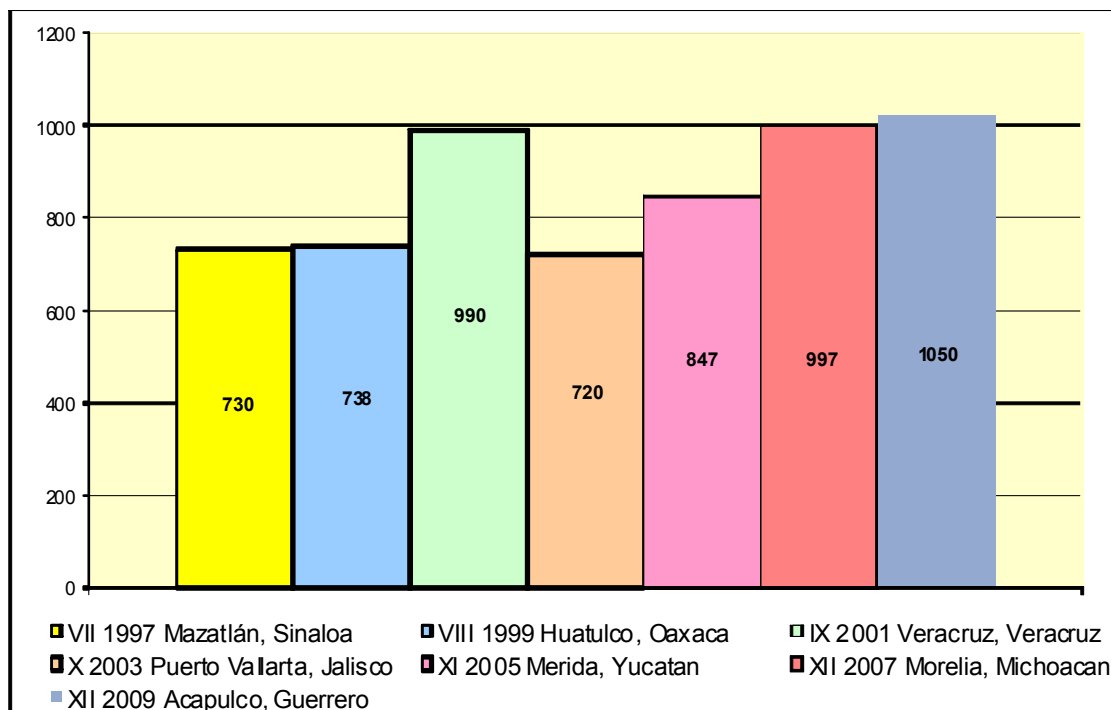
Así también, la página incluye un listado de los socios por nombre y por área de investigación; sin embargo, salvo contadas excepciones, no se ha logrado que los miembros implementen sus bitácoras. Otra de las secciones a destacar es el espacio que se ha designado a las delegaciones, mismo que solo ha sido aprovechado por las

delegaciones de Coahuila, Morelos y Yucatán. Así también, las secciones de bolsa de trabajos y de anuncios han tenido una actualización dinámica.

De acuerdo a los registros actuales, la página ha sido visitada por usuarios de prácticamente todo el mundo. Para este año, los contenidos más visitados son Noticias, La Revista, y la Bolsa de Trabajo. Por otro lado, la información incluida en la página consideramos que puede facilitar la interacción, el intercambio y la actualización de actividades académicas realizadas por los socios.

## **CONGRESO NACIONAL**

Los adelantos más recientes alcanzados en diversas áreas de la biotecnología y la bioingeniería, se dieron a conocer durante el XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y el VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras del 22 al 26 de junio del 2009 en Acapulco Guerrero. La organización conjunta de estos eventos permitió abrir nuevos espacios temáticos. Más del 65% de los asistentes al congreso fueron jóvenes estudiantes provenientes de 85 universidades, institutos tecnológicos y centros de investigación de todo el país. Este hecho refleja dos de las principales filosofías de la SMBB; que son promover la divulgación de conocimientos de frontera entre las nuevas generaciones, y fomentar la participación de todas las instituciones del país interesadas en la biotecnología y la bioingeniería. En la Fig. 5 se muestra un resumen de asistencia a los últimos 7 congresos nacionales, donde se puede observar que la asistencia al último congreso fue superior a la de los congresos anteriores (ligeramente arriba a la del congreso de Morelia), aún cuando durante en el año 2009, se presentaron dos situaciones adversas como la crisis económica y el brote de influenza en el país.

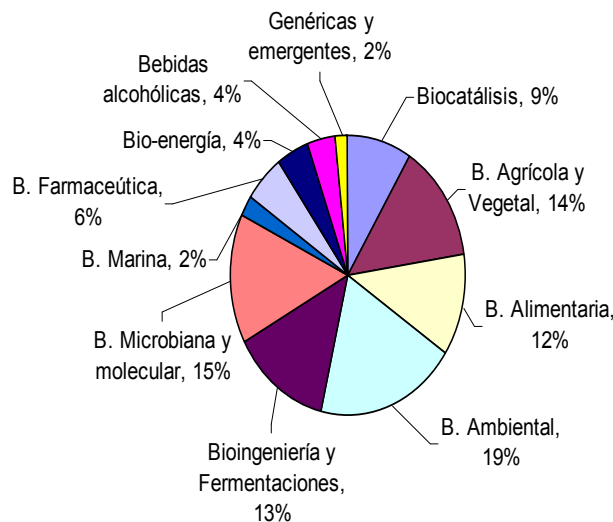


**Figura 5.** Número de asistentes a los cinco últimos congresos nacionales de la SMBB

El programa científico del congreso incluyó 834 contribuciones que se distribuyeron en forma de 10 conferencias plenarias, 11 simposios con 4 conferencias temáticas cada uno, 160 presentaciones orales y 620 en cartel.

En la Fig. 6 se muestra la proporción de las contribuciones libres orales y en cartel y cabe resaltar que en esta ocasión, dichas contribuciones fueron superiores en un 16%

en relación al último congreso realizado en Morelia. De las áreas temáticas que se trataron en el evento, la Biotecnología Ambiental, la Biotecnología Agrícola y Vegetal, y la Biotecnología Alimentaria, fueron las más representadas; en tanto que la Biotecnología Marina fue desafortunadamente la menos participativa, a pesar de los esfuerzos por promoverla al designarle un simposio temático.



**Figura 6.** Porcentaje de distribución de trabajos en las diferentes áreas del XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

Agradezco a todos mis compañeros de la MDN sin excepción su muy valioso apoyo en la puesta en marcha del evento y por haber ofrecido su mejor esfuerzo y todas sus capacidades para lograr un evento de excelencia. Un reconocimiento especial al Dr. Alfredo Martínez Jiménez, Presidente del Comité Organizador del Congreso, y a la Dra. Maricarmen Quirazco Presidenta del Comité Científico. Así también a nuestra vocal estudiante la Doctora Alaide Jiménez por su gestión para lograr un vínculo entre la SMBB y el UPIBI, a través de la Sociedad Estudiantil de Ingeniería Biotecnológica, quién solicitó pertenecer a la SMBB y apoyó las actividades del congreso.

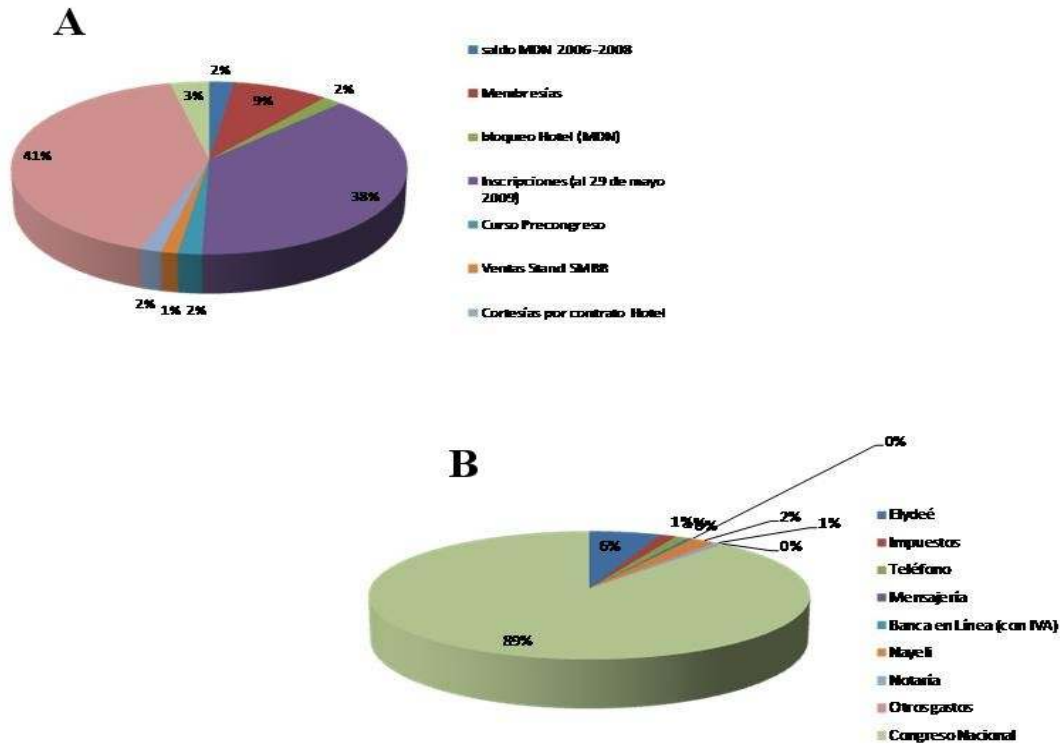
## ESTADO FINANCIERO

El estado financiero de la Sociedad continúa siendo precario. Como fue anunciado en la administración pasada, la

situación económica es crítica y los ingresos recibidos por concepto de membresías difícilmente permiten mantener todos los gastos habituales de la SMBB. Desde hace cuatro años, se tomó la decisión de cobrar las membresías en forma bianual. Esta acción ha provocado que la SMBB perdiera su capacidad de recuperación. En base a esta experiencia, la MDN saliente exhorta a que se considere regresar al calendario de pagos anuales, o bien, si se continúa con los pagos bianuales; se incrementen las cuotas con el propósito de encontrar soluciones que contribuyan a resolver el estado financiero de la sociedad.

Sin duda alguna, el congreso constituye el gasto más importante al que se enfrentan las mesas directivas nacionales. En la Fig. 7 se presenta un resumen de los ingresos y egresos durante el bienio, donde claramente se puede apreciar que el congreso consumió un 89% de todas las erogaciones

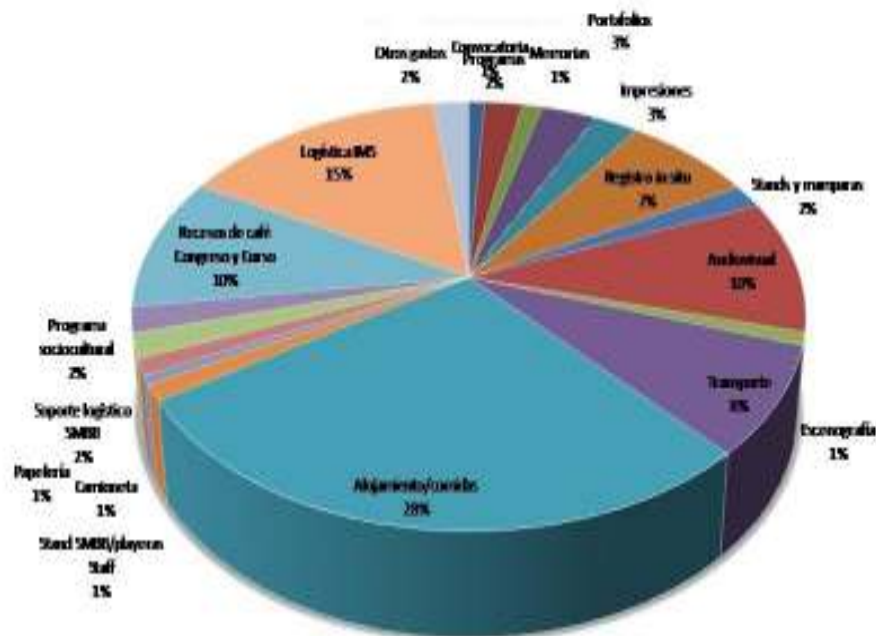
# INFORME FINAL MDN 2008-2010



**Figura 7.** Resumen de Ingresos y Egresos de la SMBB durante 2008-2010

En la Fig. 8 se resumen los egresos en ocasión del Congreso Nacional y el SIPAL, donde se puede observar que la mayoría de los gastos (memorias, programas y portafolios entre otros) fueron erogaciones

directas de la SMBB, ya que debido a la crisis económica, en esta ocasión no se contó con los apoyos económicos habituales de muchos patrocinadores



**Figura 9.** Egresos durante el XIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería y el VII Simposio Internacional de Alcoholes y Levaduras

## PATROCINIOS

Debido a la situación que ha sido expuesta, la MDN ha buscado estrategias que permitan compensar de alguna manera, las necesidades económicas que enfrenta la sociedad; por ejemplo, buscando patrocinios. Cabe mencionar que se ha implementado un sistema de anuncios en la página web, donde mediante el pago de una cuota, las compañías pueden difundir productos que eventualmente sean de utilidad para los biotecnólogos. Hasta el momento, solo se ha logrado un patrocinio importante por parte de la compañía Applikon y otro menor por parte de Mary Ann Liebert.

En relación a los patrocinios que se obtuvieron para la realización del congreso nacional, cabe mencionar que las aportaciones de las instituciones siguen siendo importantes, así como los apoyos de los patrocinadores habituales que han sido más constantes, y que corresponden a los otorgados por Yakult y por la empresa Applikon.

Para la realización del décimo tercer congreso nacional, es importante señalar que la MDN se dio a la tarea de buscar otros patrocinios extraordinarios, habiendo

conseguido en esta ocasión, una aportación importante por parte de la Subsecretaría de Educación Pública, que junto con otro donativo otorgada por la asociación de empresas Agrobio, nos permitió becar a 100 estudiantes provenientes de todo el país. Esta es la primera ocasión en que es posible becar a un número importante de estudiantes para que asistan al congreso nacional. Por otro lado, también fue posible conseguir financiamiento del CONACYT para apoyar al VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras, que se realizó en conjunto con el congreso.

## PARTICIPACION EN OTROS EVENTOS Y ACTIVIDADES

La MDN participó y apoyó diversas actividades de las delegaciones, como son las siguientes: la Delegación Yucatán realizó su IV Congreso Regional en octubre del 2008 y su cambio de mesa directiva este en 2010.. La Delegación Coahuila a su vez, realizó su primer Simposio sobre Bioingeniería en febrero del 2010, en tanto que su cambio de mesa se llevó a cabo en 2009. La Delegación Morelos realizó en octubre del 2009 el primer "Foro sobre

Influencia Matices Científicos y Percepción Social”

Otras actividades de la mesa fueron las siguientes:

Organización del Curso “Producción de Rones” que se llevó a cabo como parte del SIPAL durante el XIII Congreso Nacional. Es importante señalar que por primera ocasión en relación a los cursos que organiza la sociedad, este curso dejó saldo positivo considerable, debido a la temática del mismo y a las cuotas que fueron establecidas.

Apoyo para la realización del Quinto Congreso Internacional de Probióticos en Abril de 2010.

Participación en el “Foro Equidad de Género” en marzo del 2010 y también se participó activamente en la organización del Congreso Internacional RedBio 2010 a celebrarse en noviembre de 2010, en la ciudad de Guadalajara.

Una de las tareas más satisfactorias de concluir un período como el que he informado, es el tener la oportunidad de agradecer públicamente, como lo he venido mencionando y una vez más, a cada uno de mis compañeros de la MDN, por haber aceptado el gran reto de dirigir a una sociedad como esta, sin escatimar ni tiempos ni esfuerzos, y haciendo un profundo ejercicio de talento y libertad en beneficio de nuestra querida SMBB. A todos ellos, mi mayor reconocimiento.

Aprovecho también la ocasión para desearles a mis compañeros de la MDN 2010 - 2012 el mayor de los éxitos en su gestión, que sin duda alguna, realizarán con el esmero que ha sido habitual y que ha contribuido a darle identidad a la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, pero también seguramente impulsarán otros empeños.

Finalmente, agradezco a todos ustedes el haberme brindado el honor de presidir a esta gran sociedad, Este nombramiento de gestión académica fue y seguirá siendo uno de los más importante que he recibido en mi vida profesional.

Dra. María Luisa Villarreal Ortega  
Septiembre 2010

# TOMA DE PROTESTA MDN 2010-2012

## Toma de Protesta

### Mesa Directiva Nacional

#### Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería 2010-2012

10 de Septiembre de 2010

#### Unidad Académica de Seminarios – Academia Mexicana de Ciencias A.C.

**Dr. Alfredo Martínez Jiménez**

**Presidente SMBB 2010-2012**

Estimados Doctores Gómez y Barona, familiares de los aquí presentes, colegas, amigos y socios de la nuestra querida sociedad:

Primero que nada quiero agradecer a mis compañeras-colegas y amigas de la mesa directiva nacional que hoy rinde su informe de actividades (¡que mal acompañado estaba!, puras mujeres emprendedoras). Gracias por todo lo que me enseñaron. María Luisa, gracias por mostrarme que el mundo de la biotecnología es muy grande y comprende muchos actores. Alaide, gracias por tu entusiasmo a todas las tareas que te encomendamos. Ana, gracias por todo tu apoyo en los premios y por recordarme, siempre que te veía, que la equidad de género es una virtud. Elydeé, gracias por ser la memoria viviente de nuestra sociedad. Maricarmén, gracias por tu trabajo sistemático y siempre bien organizado, pero sobre todo meticulosamente planeado a la perfección. Marisol, mil gracias por todo, sin ti no estaría aquí, gracias por apoyar cada detalle de todas las actividades de la SMBB y por recordarme siempre que hay que hacer y hacerlo bien.

Estimados socios de nuestra querida SMBB, les agradezco el haber depositado hace dos años su confianza en mí para presidir esta mesa directiva, espero no haberlos defraudado en estos dos años de labor en la vicepresidencia y les prometo que haré un mejor esfuerzo para estos dos años en la dirección de la SMBB. Después de 13

mesas directivas, excelentemente conducidas, mejorar el trabajo de cualquiera de ellas es un gran reto. Sin embargo, junto con mis colegas que conforman la mesa directiva 2010-2012, los doctores Gerardo Saucedo (Vicepresidente), Octavio Loera (Secretario), Romina Rodríguez (Subsecretaria), Mauricio Trujillo (Tesorero), la M en C Ofelia Carreón (asistente), M en B. María Teresa Torres Mancera (vocal estudiante) y Dr. Carlos Regalado González (vocal profesional), hemos tomado la responsabilidad de conducir por el mejor de los caminos a nuestra sociedad.

Continuaremos con el fomento de la biotecnología y bioingeniería en el país, esto es la vinculación académica de los socios, el fomento a la formación de recursos humanos en el área, la realización de cursos, vinculación con otros sectores como el público, privado y la sociedad en general y la realización del congreso nacional, entre otros.

#### **Plan de Trabajo de la MDN de la SMBB 2010-2012**

Existen varias tareas que la SMBB debe realizar, entre estas de forma enunciativa, pero no exclusiva, se encuentran las siguientes:

Aunque con un gran avance, la base de datos de los socios requiere ser depurada. La comunicación, hacia todos nuestros socios profesionistas y numerarios, es fundamental

para realizar las actividades de la sociedad y para promover la participación activa de un mayor número de socios. La cantidad de socios estudiantes, el 66%, es dinámica y por tanto debemos entender esta situación para fomentar el ingreso de nuevos estudiantes y fortalecer su permanencia mediante estímulos.

Como nos acaba de presentar la Dra. Villarreal, la página electrónica de la sociedad ahora "tiene vida" (le agregamos algo al menos cada 15 días), es dinámica, está bien organizada, tiene un sistema de búsqueda interno muy eficiente y como todo en esta vida todavía es perfectible. La página es muy visitada y por tanto ahora, aparte de la información académica, también contamos con publicidad. En promedio durante los últimos doce meses hemos tenido más de cinco mil visitas por mes, estas visitas no son solo de México, existe un alto porcentaje de consultas de países latinoamericanos y en menor proporción de Norteamérica y Europa. Aún con lo realizado a la fecha, debemos mejorar el contenido y calidad de la página para incidir en una mayor actividad de la misma y usarla como una plataforma para generar recursos económicos.

A manera de ejemplo, de abril de 2009 a abril de 2010, las dos secciones más visitadas fueron la de "miembros de la SMBB" y la de la "Revista", en promedio con más de 40 visitas por día cada una. En este sentido fomentaremos la adición de información por parte de los socios en la sección de "miembros".

Como comenté, la "Revista Biotecnología y Bioingeniería" es muy visitada y es muy útil. La revista, gracias al trabajo de los editores pasados y actualmente al excelente trabajo del Dr. Sánchez Esquivel y su grupo de editores es reconocida en muchos ámbitos. Por ejemplo, a finales del año pasado publicamos un número especial de Biocombustibles y Biotecnología. A partir de lo publicado en la página, hemos recibido numerosas consultas, invitaciones a presentaciones y a colaborar con colegas en países como Brasil, Chile y Colombia. Aunque ahora ya no se imprime la revista, la versión electrónica permite una mayor difusión y debemos aprovecharla. Vamos a fomentar una mayor participación de

nuestros socios y colegas en general a que continúen sometiendo sus trabajos a la revista Biotecnología y Bioingeniería.

Mantener en el padrón de excelencia los registros de la SMBB como son el RENIECYT, SEP, SEDESOL y el ISBN de la revista, capitalizar su empleo en beneficio de las actividades de la sociedad.

Mantener asesorías con ex-presidentes de la SMBB para solventar asuntos de la sociedad.

Mantener los premios que otorga la sociedad, Carlos Casas Campillo, Alfredo Sánchez Marroquín y Sergio Sánchez Esquivel, así como capitalizar el patrocinio permanente de ellos al través de compañías serias en el campo de la biotecnología y bioingeniería.

Concretar la incorporación de la delegación Puebla, que está a punto de cumplir con todos los requisitos para conformarse como delegación, además de que han mantenido un interés sincero y nato desde hace un año para formalizar su funcionamiento. Fomentaremos la continuación de las actividades de nuestras tres delegaciones más activas: Coahuila, Morelos y Yucatán.

Promover el acceso de información eficiente para la publicación de oportunidades de trabajo para nuestros socios y egresados, por medio de los comunicados vía correo electrónico de nuestra base de datos y de la sección "Bolsa de trabajo", la cual fue visitada aproximadamente 350 veces por mes de febrero a agosto del presente año, pero que desafortunadamente tiene poca información al respecto.

La realización y mantener la calidad académica, social y logística del congreso bianual, así como de finanzas sanas, es una prioridad de esta nueva mesa directiva. Hemos avanzado en la definición de la sede y otros aspectos generales del XIV Congreso nacional de la SMBB, este se realizará del 19 al 24 de Junio en la ciudad de Querétaro, Qro. El hotel sede será definido en breve.

La situación económica de la sociedad es precaria y hemos analizado el incremento

racionado de las cuotas de membresía de forma que logremos una mejor captación de recursos. Realizaremos el cobro directo de las cuotas bianuales y, con el fin de incrementar el control en el pago de cuotas, diferenciaremos los cobros a los socios profesionales y numerarios en años pares y a los estudiantes en años nones.

Un objetivo que queremos lograr es sanear y mejorar las finanzas de la sociedad, incluyendo un reglamento al respecto. Serán las cuotas, apoyos institucionales, cursos, publicidad, patrocinios, que deben ser pensados, planeados, organizados y sobre todo ejecutados.

Por último les quiero agradecer a todos ustedes la participación en este evento, pero sobre todo les quiero solicitar que continúen con su apoyo decidido hacia las actividades de la SMBB.

Mil gracias por su atención.



**La SMBB**

invita

a investigadores, profesionales, estudiantes  
y empresarios a participar en el:

## **XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería**

**Querétaro, Qro.  
Hotel Misión Juriquilla  
19 a 24 de Junio, 2011**



<http://www.smbb.com>

Sociedad Mexicana de  
Biotecnología y Bioingeniería





[www.smbb.com.mx](http://www.smbb.com.mx)