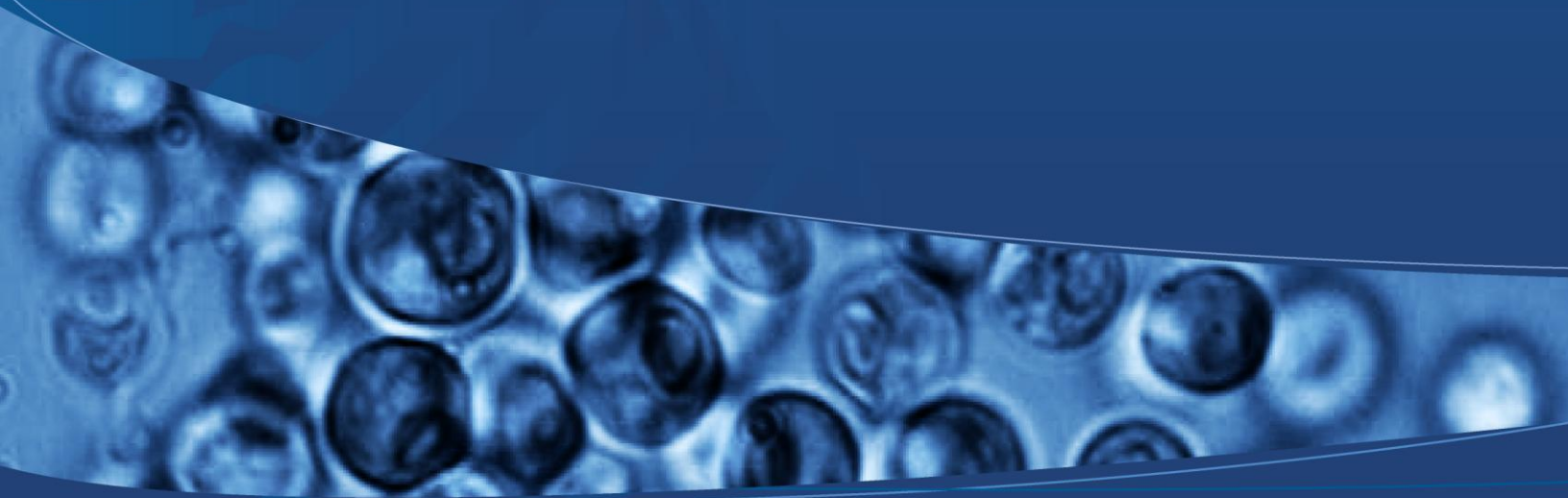


Revista de la Sociedad Mexicana de

Biotecnología y Bioingeniería A.C.



Año 2012 Volúmen 16 Número 2
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería



Revista de la Sociedad Mexicana de **Biotecnología 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. Maria Teresa Torres Mancera
Vocal Estudiante

COORDINADOR EDITORIAL

Ing. Rubén Castillo Alamilla

FORMACION EDITORIAL

Ing. Rubén Castillo Alamilla

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

Dr. Víctor Manuel Loyola
**Centro de Investigación Científica de
Yucatán**

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

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología 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

La SMBB a 30 años de su fundación

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

4

Instrucciones para autores

6

Semblanza de mis recuerdos sobre Carlos Huitrón Vargas

Dr. Gustavo Viniegra González

11

ARTÍCULOS

Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro

Dra. Susana Saval Bohórquez

14

Producción de Pectinasas por *Aspergillus flavipes* FP-500 en Cultivo Alimentado

Aurora Martínez-Trujillo, Juan S. Aranda, Guillermo Aguilar-Osorio

47

Variación del Complejo Pectinolítico del Sistema Inmovilizado de *Aspergillus* HL por Efecto del pH y Temperatura

Nohemí Reyes, Ignacio Islas, Rosa Domínguez, Gerardo Rivera y Sara Solís

67

El Potencial de las Plantas para Suministrar Materia Prima para la Producción de Biocombustibles

Víctor M. Loyola-Vargas, Jorge Luis García-Almada, María Teresa Cadenas-González y Rosa M. Galáz-Ávalos

79

Jatropha curcas una Alternativa para la Obtención de Biodiésel sin Afectar al Sector Alimentario

Rosa Ma. Galaz-Ávalos, Randy Noé Avilez-Montalvo, Celia Maricruz Ucan-Uc, Javier Adolfo Chan-López y Víctor M. Loyola-Vargas

94

Charcas Salineras: Ecosistemas Susceptibles de ser Usados para la Recuperación de Enzimas de Interés Industrial

Silvia Cabrera-López, Gustavo A. Rivera-Solís, José B. Escamilla-Sánchez, Jorge A. Tamayo-Cortes, Sergio Ortiz-Milán, Sara E. Solís-Pereira y Gerardo Rivera-Muñoz

115

El Estado Actual del Proteoma de *Aspergillus*

Lizzete Ruth Torres y Guillermo Aguilar Osorio

129

LA SMBB A 30 AÑOS DE SU FUNDACIÓN

El pasado 30 de Junio del 2012 se cumplieron treinta años de la fundación de la **Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB)**. En esa fecha, pero del año de 1982, nos reunimos 26 personas, entre investigadores, industriales y estudiantes de los campos de la biotecnología y bioingeniería, para firmar el **Acta Constitutiva** de la primera sociedad que en esas disciplinas se establecía en nuestro país. Apadrinados por el CONACYT, la reunión se llevó a cabo a las 18 horas de un día miércoles del mes de Junio, en la entonces instalaciones del propio CONACyT, ubicadas al sur de la ciudad de México, en la Ciudad Universitaria. En ese sitio y en esa fecha y hora, los ahí presentes manifestamos nuestra libre voluntad para constituirmos como una nueva asociación civil. Dicha reunión vino a cristalizar el esfuerzo de varios años de trabajo de un grupo de investigadores y profesionales interesados en asociar y representar a los profesionales y estudiantes de la biotecnología y la bioingeniería de México. Con esta asociación se buscaba promover esas disciplinas, así como dar a conocer las actividades científicas y tecnológicas de sus asociados. Fomentar la vinculación y la transferencia de tecnología entre los sectores académico y productivo del país, tanto publico como privado. Impulsar la formación de profesionales en biotecnología y bioingeniería, a través de revisar y discutir los planes de enseñanza correspondientes practicados en ese momento en el país y promover la expedición de leyes, reglamentos y reformas relativas a su ejercicio profesional.

La **Sociedad** fue concebida de tal forma, que no daba margen a un predominio institucional en su organización y en sus perspectivas de desarrollo, es decir, se inició mas con la filosofía de asociar por convicción que por obligación o control.

Treinta años después tengo el privilegio de ver los resultados de ese proyecto. Ver una **Sociedad** robusta que pasó de 26 a más de 1000 socios numerarios, profesionales y estudiantes, organizados en once delegaciones y el Distrito Federal. Una asociación que cada dos años lleva a cabo un Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería en el interior del país. Una **Sociedad** llena de juventud y dinamismo, al ser promotora de diversos eventos como conferencias, mesas redondas y cursos cortos. Organizadora de los premios **Carlos Casas Campillo y Alfredo Sánchez Marroquín**, reconocimiento

establecido por la SMBB para honrar a dos ilustres mexicanos que fueron pioneros de estas disciplinas en nuestro país. Influyente, a través de sus miembros, en las políticas de ciencia y tecnología que inciden de manera directa en la vida científica e industrial del país.

Participativa de los avances científicos y tecnológicos mas modernos y en la forma de hacerlos llegar a los usuarios naturales de los mismos. Formativa e informativa, a través de la edición de libros y de la revista periódica **BioTecnología**, su órgano oficial de comunicación.

Como puede verse, los logros son muchos y sin duda son el resultado de la participación de todos sus asociados. Algunos de ellos lo han hecho directamente en la organización de planes y ejecución de proyectos sobre su proyección y consolidación, otros de manera indirecta, pero el esfuerzo de todos ha resultado en lo que somos ahora como **Sociedad**. Todos ellos, hombres y mujeres de manera generosa y comprometida han dado su mejor esfuerzo para el desarrollo y fortalecimiento de la **SMBB**. Personajes que con su trabajo han contribuido al progreso científico y tecnológico del país. Dentro de tales personajes, debemos destacar la labor de **Carlos Huitrón** a quien la **SMBB** dedica el presente volumen como un homenaje a su labor en la presidencia de la misma en el período de 1984-1986. **Carlos** fue pionero del proyecto de ésta Sociedad que ahora cumple 30 años de existencia y cuenta con más de 800 miembros activos. No todos los protagonistas de este proyecto podemos dar fe de la dimensión actual del mismo. Algunos se nos han adelantado en el camino, pero ellos dejaron en la **SMBB** una muestra profunda de su trabajo, cuyos resultados hace algunos años hubiesen parecido impensables o utópicos.

Distinguidos colegas miembros de la **SMBB**, es un orgullo para un servidor pertenecer a la SMBB, es claro que el esfuerzo realizado por sus asociados durante 30 años no ha sido en vano ya que pertenecemos a una asociación que sin duda ha alcanzado representatividad e importancia nacional. Sigamos trabajando en ese mismo camino, sigamos esforzándonos para llevar a nuestra Sociedad a un nivel de importancia internacional.

Sergio Sánchez Esquivel

Presidente fundador de la SMBB
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,
Instituto de investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México
sersan@biomedicas.unam.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 el Español y el 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, μ l), de peso (kg, g, mg, μ 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 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.

Instrucciones para los autores

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.
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

Instrucciones para los autores

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 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^a 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. 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.

Breve Semblanza de Mis Recuerdos Sobre CARLOS HUITRÓN VARGAS

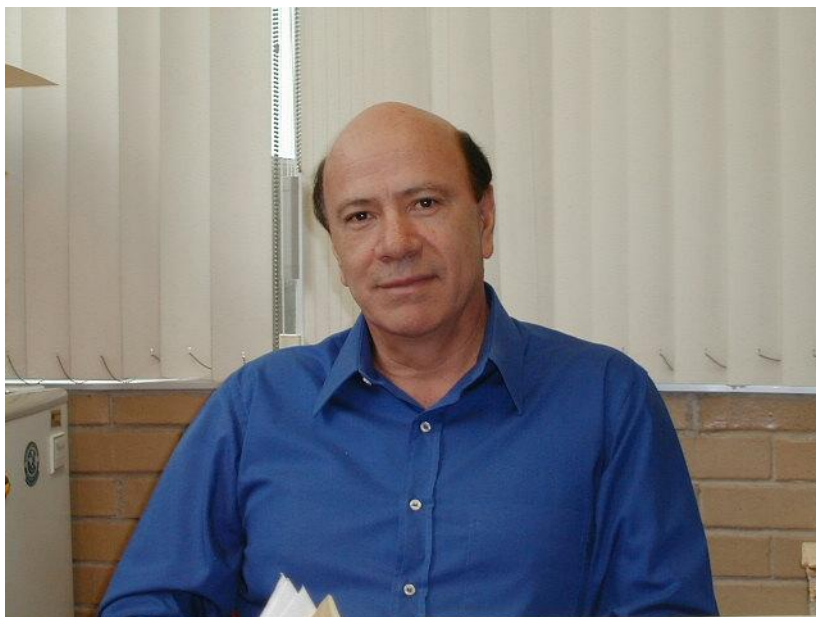


Foto: Archivo del Departamento de Prensa y Difusión, IIB

Conocí a **Carlos Huitrón** en 1972, en el inicio del núcleo seminal de la biotecnología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, junto con Sergio Sánchez Esquivel y Jorge Limón-Lason. Él ya tenía experiencia de investigación colaborando con el grupo de Jaime Mora. De ahí surgió su primera publicación, teniendo como colaboradores a Rafael Palacios y a Guillermo Soberón, en el tema del metabolismo nitrogenado (Tarrab et al., 1974) que es su artículo científico más citado. Más adelante, con Jorge Limón-Lason (Huitrón y Limón-Lason, 1978) empezó su fructífera trayectoria de estudios de enzimología aplicada a la biotecnología, con un estudio sobre la inmovilización de la enzima glucosa isomerasa, pues ese fue el tema de cooperación acordado para que el nuevo grupo adquiriese experiencia en un área de posible aplicación a la industria azucarera y con ese tema se dirigió, a principios de la década de 1970, junto con Jorge Limón-Lason para realizar una estancia de investigación en el University College con el grupo de Malcolm Lilly que, por esa época era pionero de la enzimología industrial.

De regreso a México, **Carlos** se interesó cada vez más en problema de la síntesis de los complejos enzimáticos hidrolíticos, con actividades de pectinasa, celulasa y xilanasa. Este interés provino de una estancia que hizo en el Instituto Tecnológico de Mérida a fines de los años 1970. De ahí también su interés en estudiar la degradación del henequén y la transformación de las sapogeninas que dieron lugar a nuevas publicaciones. Para esa época yo había dejado el Instituto de Investigaciones Biomédicas para aceptar formar un nuevo grupo en la Universidad Autónoma Metropolitana de Iztapalapa, dónde hasta ahora

laboro. En 1982, **Carlos** me invitó a formar parte del grupo fundador de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería y cuatro años más adelante, me propuso que fuese el tercer presidente de nuestra asociación. Esta acción fue un atrevimiento visionario de él para darle a la SMByB un carácter multi-institucional que la ha caracterizado, pues temía que este ambicioso proyecto quedase circunscrito a un grupo cerrado dentro de la UNAM. Me pareció un gesto afectuoso y generoso de su parte y acepté.

La colaboración de nuestro grupo con **Carlos Huitrón** siguió senderos inesperados, pues una de sus mejores alumnas, Sara Solís Pereira, resultó ser una excelente colaboradora con quien publicamos dos de los trabajos más citados de nuestro grupo sobre la aparente resistencia a la represión catabólica de la síntesis de las pectinasas en las fermentaciones en medio sólido (FMS) que también fue ampliado con el trabajo de María Elena Acuña Argüelles quien también había sido formada inicialmente por **Carlos Huitrón**. Para este fin contamos con la donación por **Carlos** de algunas cepas de *Aspergillus niger*, que denominamos CH por razones obvias y nos fueron muy útiles para el arranque de nuestro trabajo sobre pectinasas. Otro camino de colaboración indirecta, fue el trabajo conjunto con su amigo cercano, Guillermo Aguilar y su esposa Blanca Trejo, sobre algunas variaciones de este tema y con quienes publicamos un trabajo de colaboración con Alfredo Minjares.

Una de las contribuciones más originales que leí de **Carlos Huitrón**, fue la idea de usar un sistema de lote alimentado para demostrar que la productividad de la producción de pectinasas podía ser muy alta si el fermentador estaba programado a mantener una concentración de azúcares menor de 10 gramos por litro (Huitrón y Aguilar, 1986, 1987, 1990; Larios et al., 1989). Esta observación fue muy útil para que nosotros formulásemos la hipótesis de que quizás en la FMS la aparente resistencia a la represión catabólica se debía a la manutención fisiológica de bajos niveles locales de azúcares (Viniegra-González y Favela-Torres, 2006). También fue útil para fijar las condiciones de inducción de pectinasas usando azúcar y pectina, a bajas concentraciones y en medios agitados. Por medio de estas líneas quiero dar reconocimiento a la contribución que tuvo **Carlos** para ayudar a formar mejor nuestras ideas sobre los problemas de la biosíntesis de enzimas en el sistema de FMS.

Años después he podido constatar que **Carlos Huitrón**, aún con problemas de salud, pudo continuar sus publicaciones hasta 2009, en los mismos temas de producción de enzimas y esto habla mucho a favor de su carácter tesonero.

Carlos fue un pionero, junto con sus colegas y amigos Jorge Thomé Ortiz, Fernando García Hernández, Jorge A. Limón-Lason y Sergio Sánchez Esquivel, para lanzar un proyecto tan quimérico o quijotesco en 1982, que fue la formación de nuestra querida SMByB que ahora cumple 30 años de existencia y cuenta con cerca de 800 miembros. Muchos de ellos con notables avances en la frontera de nuestro campo de investigación y con algunas aplicaciones sobresalientes a la industria nacional.

REFERENCIAS

- Aguilar G & Huitron C (1986) Application of fed-batch cultures in the production of extracellular pectinases by *Aspergillus* sp. *Enzyme Microb. Technol.* 8: 541-545.
- Aguilar G & Huitron C (1987) Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp. by galacturonic acid and glucose addition. *Enzyme Microb. Technol.* 9: 690-696.
- Aguilar G & Huitron C (1990) Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon sources. *Biotechnol. Lett.* 12: 655-660.
- Huitron C & Limon-Lason J (1978) Immobilization of glucose isomerase to ion-exchange materials. *Biotechnol. Bioeng.* 20: 1377-1391.
- Larios G, Garcia JM & Huitron C (1989) Endo-polygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Biotechnol. Lett.* 11: 729-734.
- Tarrab R, Rodriguez J, Huitron C, Palacios R & Soberon G (1974) Molecular-forms of rat-liver arginase - Isolation and characterization. *European J. Biochem.* 49: 457-468.
- Viniegra-Gonzalez G & Favela-Torres E (2006) Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression? *Food Technol. Biotechnol.* 44: 397-406.

Gustavo Viniegra González

Departamento de Biotecnología
Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa
E-mail: vini@xanum.uam.mx

Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro

Susana Saval

Instituto de Ingeniería, UNAM, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510

ssavalb@iingen.unam.mx

RESUMEN

Desde hace varias décadas los residuos agroindustriales han sido un foco de atención para varios investigadores a nivel mundial, debido a que parte de sus constituyentes pueden ser materia prima para generar diversos productos de interés, esta situación sigue prevaleciendo en la actualidad y se prevé que continuará en el futuro. Este artículo trata de resumir las experiencias de varios autores y los aspectos más relevantes del aprovechamiento de una variedad de residuos agroindustriales, la revisión bibliográfica corresponde a una muestra de artículos que se identificaron en la base de datos Science Direct dentro del período 1982 a febrero de 2012. También se plantea la necesidad de atender de una manera ambientalmente responsable, la disposición final de los residuos que ya no pueden ser reutilizados, tomando como base el marco regulatorio vigente, para evitar que se conviertan en contaminantes de suelos y agua subterránea.

Palabras clave: residuos agroindustriales, desechos agroindustriales, residuos lignocelulósicos, desechos lignocelulósicos, biocombustibles, residuos como contaminantes de suelo y agua subterránea.

ABSTRACT

For several decades agro-industrial residues has been the focus of attention of several researchers worldwide, because some of its elements may be raw materials to create various products of interest; a situation that keeps on prevailing today and it is expected to continue in the future. This article tries to summarize the experiences of several authors and the key aspects of the exploitation of a variety of agro-industrial residues. The related literature is a sample of articles pinpointed in the Science Direct database from 1982 to February 2012. In addition, it also sets out the need of handling the disposal of waste that cannot be recycled, with an environmentally responsible behavior; so they cannot lead to the pollution of soils and groundwater, a task that must be based on the regulatory framework in force.

Key words: agroindustrial residues, agroindustrial wastes, lignocellulosic residues, lignocellulosic wastes, biofuels, residues as contaminants of soils and groundwater.

INTRODUCCIÓN

En la década de los años 70, una parte importante de los biotecnólogos de todo el mundo enfocaron sus investigaciones hacia la utilización y aprovechamiento de los residuos agroindustriales para la producción de compuestos útiles como insumos de otros procesos industriales; los primeros años la prioridad se enfocó a la generación de productos con valor agregado, años más tarde se sumó la prioridad de utilizar los residuos para reducir el impacto ambiental que ocasiona su disposición, y a partir del presente siglo la prioridad está enfocada a la producción de bioenergéticos y a la elaboración de nuevas formulaciones de alimentos para animales.

El presente artículo, fue escrito con la mejor intención de rendir un homenaje al Dr. Carlos Huitrón Vargas, uno de los promotores de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C., y líder en su tiempo, en el área de producción de enzimas de interés práctico a partir de residuos agroindustriales.

LOS RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Entre los diferentes enfoques que existen para definir a la “agroindustria”. Se dice que es una “actividad que integra la producción primaria agrícola, pecuaria o forestal, el proceso de beneficio o transformación, así como la comercialización del producto, sin dejar de lado los aspectos de administración, mercadotecnia y financiamiento”. Dicho en otros términos, es una actividad económica que combina el proceso productivo agrícola

con el industrial para generar alimentos o materias primas semi-elaboradas destinadas al mercado. También se dice que constituye una parte del sector industrial que se dedica a producir y/o transformar, almacenar y comercializar productos provenientes del campo. Entre los productos que se industrializan están: frutas, verduras, raíces, semillas, hojas, tubérculos y vainas; algunos se comercializan en fresco y otros son transformados en néctares, jugos, mermeladas, ensaladas, harinas, aceites, vinos, concentrados en polvo y conservas, por mencionar algunos. La tendencia mundial es el notable crecimiento en la generación de residuos, derivado del incremento en la generación de productos comercializables.

A partir del marco de referencia anterior, se puede entonces decir que los residuos agroindustriales son materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, y que ya no son de utilidad para el proceso que los generó, pero que son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico, de interés comercial y/o social. El problema al que se enfrentan los residuos agroindustriales es que no existe una clara conciencia ambiental para su manejo, además de que falta capacidad tecnológica y recursos económicos para darles un destino final, así como una legislación específica para promover la gestión de este tipo de residuos, que asegure un buen manejo desde su generación hasta

su disposición final. Aún en nuestros días, esta problemática prevalece a nivel mundial.

Con cierta frecuencia al hablar sobre el tema utilizamos en forma indistinta los términos: subproductos, residuos y desechos, sin importar que existe una diferencia conceptual entre ellos. Un “subproducto” es un producto secundario, bien conocido, generalmente útil, comercializable y por lo tanto con valor agregado, que resulta de un proceso industrial. El término “residuos”, se aplica a aquellos que pueden tener o no un valor comercial, porque son poco comunes o porque se generan en bajas cantidades, sin embargo, algunos de sus constituyentes aún en baja proporción, le pueden conferir algún interés para su utilización. Desde este punto de vista, los términos “subproducto” y “residuo” podrían utilizarse como sinónimos, no así el término “desecho”, que está referido a aquellos materiales que no tienen algún valor comercial, ni poseen atributos de interés para ser utilizados en algún proceso, por lo que se consideran como basura y se les debe dar una disposición final.

En general, las características de los residuos agroindustriales son muy variadas, dependen de la materia prima y del proceso que los generó, no obstante, comparten una característica principal que es el contenido de materia orgánica, constituida por diferentes porcentajes de celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina. Por ser la materia orgánica su principal componente, en la práctica se les denomina “residuos orgánicos”, dentro de este rubro se incluyen otros residuos, como los lodos de plantas de

tratamiento de aguas residuales, la hojarasca de parques y jardines, así como los residuos domésticos y residuos sólidos municipales.

Valdez-Vazquez *et al.* (2010), publicaron datos oficiales de 2006 que establecen que en México se produjeron 75.73 millones de toneladas de materia seca proveniente de 20 cultivos, de los cuales 60.13 millones de toneladas corresponden a residuos primarios, obtenidos al momento de la cosecha, entre los que están: hojas y tallos del maíz, tallos y vaina de sorgo, puntas y hojas de caña de azúcar, paja de trigo, paja de cebada y de frijol, así como cáscara de algodón. El resto, 15.60 millones de toneladas corresponden a residuos secundarios obtenidos del procesamiento post-cosecha, entre los que están: bagazo de caña de azúcar, mazorcas y olotes, bagazo de maguey o agave, así como pulpa de café.

Algunos datos que sirven para tener una idea del volumen de residuos que generan diferentes tipos de industrias son los siguientes: la industria de la cerveza solamente utiliza el 8% de los componentes del grano, el resto 92%, es un residuo; la industria del aceite de palma utiliza el 9%, el 91% restante es un residuo; la industria del café utiliza el 9.5%, el 90.5% restante es un residuo y la industria del papel utiliza menos del 30%, el resto es un residuo.

Al buscar una oportunidad de aprovechamiento de los residuos, se hace necesaria su caracterización para conocer su composición, la calidad de sus componentes y la cantidad que se genera, con esto se pueden definir las tecnologías más apropiadas para su aprovechamiento y

posterior tratamiento. Respecto a esto último, es de esperar que después del aprovechamiento de un residuo se genere un siguiente residuo más agotado que podría tener otra aplicación, o bien, convertirse en un desecho. En la búsqueda de oportunidades de aprovechamiento de residuos este aspecto deberá ser considerado, con un enfoque de responsabilidad ambiental.

CRITERIOS DE SELECCIÓN DE RESIDUOS CON FINES DE APROVECHAMIENTO

Al paso de los años, se han definido criterios de selección de los residuos para ser aprovechados con fines biotecnológicos, algunos de ellos son:

- Que el principal componente del residuo pueda ser utilizado como sustrato para la producción fermentativa de insumos de procesos industriales, o bien, que el material pueda ser sometido a extracciones para recuperar alguno de sus componentes que tenga un mercado demandante.
- Que el residuo esté disponible localmente y en las cantidades necesarias para asegurar la fabricación de un producto de interés.
- Que no tenga otras aplicaciones o usos que compitan con el proceso que se pretende promover.
- Que no requiera pretratamiento, y en caso de requerirlo, que éste sea sencillo y económico.

- Que la disponibilidad del residuo permita planificar el proceso para el cual se va a utilizar.

- Que sea estable, es decir, que no se descomponga fácilmente bajo las condiciones ambientales del sitio donde se genera.

Con el marco de referencia anterior, se resumen ejemplos de los diferentes usos que se le han dado a diversos tipos de residuos agroindustriales, con base en la siguiente clasificación:

- Como sustrato para la producción fermentativa de metabolitos de interés.
- Como sustrato para la generación de bioenergéticos.
- Como mejoradores o acondicionadores de suelo obtenidos mediante composteo.
- Como suplemento alimenticio para animales.

Por otro lado, cuando los residuos no son reutilizados y se abandonan en el lugar donde se generaron, se convierten en contaminantes de suelos y aguas subterráneas. Este tema se aborda después de revisar los diferentes usos de los residuos.

RESIDUOS AGROINDUSTRIALES COMO SUSTRATO PARA LA PRODUCCIÓN FERMENTATIVA DE METABOLITOS DE INTERÉS

Subproductos y residuos provenientes de diferentes agroindustrias, conteniendo cantidades importantes de celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina, son sustratos atractivos para la producción de enzimas de

aplicación industrial, principalmente de aquellas que son inducibles, entre las que destacan: las celulasas, las hemicelulasas, las xilanasas y las pectinasas, las cuales marcaron una época en la historia de la biotecnología.

En el caso específico de las pectinasas, el Dr. Carlos Huitrón y su grupo de trabajo, promovieron el aprovechamiento de la pulpa de henequén, un subproducto rico en pectina que resulta del proceso de eliminación de fibras de las hojas del henequén. Este subproducto está disponible todo el año, no tiene costo y es altamente susceptible al ataque microbiano. A partir de una muestra de suelo sobre el cual se depositaron durante años residuos de la pulpa de henequén en una planta desfibradora, se aisló una cepa que fue identificada como *Aspergillus* sp. H43, la cual a nivel de matraces y fermentadores de 14 litros produjo una actividad pectinolítica siete veces mayor a la de una cepa de *A. niger* de colección (Huitrón *et al.*, 1984; Saval *et al.*, 1982; Saval & Huitrón, 1983; Saval *et al.*, 1983). Las investigaciones sobre la producción de las pectinasas a partir de pulpa de henequén, así como aquellas encaminadas a producir proteína unicelular se llevaron a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (Blancas *et al.*, 1982) y también formaron parte de la cartera de proyectos con la cual inició sus actividades el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), en una casona ubicada en la calle 68 entre 59 y 61, en el Centro de la Ciudad de Mérida, Yuc., la cual fue adaptada como laboratorio.

Así como el residuo de la industria henequenera, cuya producción está muy localizada en la península de Yucatán, existe una gran diversidad de residuos en todo el mundo, por lo que es de entender que las soluciones que plantean diversos investigadores vayan encaminadas a resolver problemas locales muy específicos. De la revisión que se hizo, se identificaron los reportes que se mencionan en los siguientes párrafos de esta sección.

A partir de residuos de uva con una cepa de *Aspergillus awamori*, Botella *et al.*, (2005), obtuvieron mediante fermentación sólida a nivel de laboratorio, una mezcla de celulasas, xilanasas y pectinasas, de aplicación en la industria textil, química y de alimentos.

Con una cepa de *Aspergillus niger*, mediante la fermentación sólida de residuos de soya y salvado de trigo, a nivel laboratorio Castilho *et al.* (2000), obtuvieron pectinasas para ser utilizadas en la industria de alimentos en procesos de concentración de jugos de frutas, procesos de extracción de aceites y pigmentos vegetales, así como de obtención de celulosa.

A partir de mazorcas y olotes, cáscara de avena y bagazo de caña por fermentación sumergida a nivel de laboratorio, con una cepa de *Penicillium janthinellum*, se obtuvieron enzimas xilanolíticas para ser utilizadas como aditivo en alimentos de aves de corral, fabricación de pastas, harina de trigo y procesos de blanqueo en la industria química (Oliveira *et al.*, 2006). Con el mismo objetivo, Fanchini *et al.* (2010), utilizaron bagazo de caña, salvado, avena, residuos de cebada y cáscara de yuca como sustrato y

una cepa de *Penicillium janczewskii*, en cultivo sumergido a nivel de laboratorio.

También se reporta la producción de xilanasas de diversas especies de hongos aislados de los mismos residuos donde fueron cultivados, paja de trigo, paja de arroz y bagazo de caña de azúcar; las enzimas pueden ser utilizadas para el blanqueo en la industria del papel (Abdel & El, 2001). Otros autores (Suvarna *et al.*, 2009), reportan la producción de xilanasas de *Aspergillus terreus* a partir de la fermentación sólida de la fibra de palma, a nivel de laboratorio.

Rai *et al.* (2009), obtuvieron una queratinasa a partir de residuos de pluma de gallina en fermentación sólida con una cepa de *Bacillus subtilis*, la enzima puede ser utilizada en formulaciones de detergentes para ropa.

Se reporta la producción de proteasas de *Aspergillus oryzae* en fermentación sólida de residuos provenientes de la extracción de aceite de *Jatropha curcas*; las proteasas producidas pueden ser de utilidad en la industrias de alimentos, farmacéutica y del papel (Thanapimmentha *et al.*, 2012).

Guimarães *et al.* (2007), reportaron la producción a nivel de laboratorio, de D-fructofuranosidasa a partir de residuos agroindustriales de harina de yuca, mazorcas y olotes, harina de avena, paja de arroz, bagazo de caña y salvado de trigo, por fermentación en cultivo sumergido con una cepa de *Aspergillus ochraceus*. La enzima tiene aplicación en la industria alimentaria para la elaboración de azúcares invertidos no cristalizables incluidos en mermeladas, dulces y chocolates suaves.

Utilizando una cepa de *Aspergillus japonicus*, inmovilizada en residuos lignocelulósicos provenientes de la producción de cerveza, paja de trigo, mazorcas y olotes, cáscara de café, corcho y roble, a nivel de laboratorio, Mussatto *et al.* (2009) obtuvieron fructooligosacáridos y B-fructofuranosidasa, que se utilizan en la industria farmacéutica y de alimentos.

Con una cepa de *Penicillium simplicissimum*, Godoy *et al.* (2009), obtuvieron lipasas útiles en la industria química, a partir de la fermentación sólida de residuos de semillas de ricino resultantes de la extracción del aceite.

Se reporta un estudio llevado a cabo en Colombia a nivel de laboratorio para la producción de dextrano y fructosa a partir de cáscara de naranja, piña y cachaza de caña panelera, utilizando una cepa de *Leuconostoc mesenteroides*. Como parte del estudio se realizó la separación de los productos, los autores determinaron sus características y concluyeron que la dextrosa obtenida es grado técnico y se puede utilizar como espesante en la industria de alimentos o como floculante para el tratamiento de aguas residuales (Rodríguez & Hansen, 2007).

Los residuos de piña y tallos de caña de azúcar fueron aprovechados a nivel laboratorio, por una cepa de *Gluconacetobacter swingsii* para la producción de celulosa para ser utilizada como materia prima en la industria química (Castro *et al.*, 2011).

Se reporta la producción a nivel de matraces, de un biosurfactante útil para

remediación de suelos impactados con petróleo, a partir de la fermentación de residuos de la refinación de aceite de cacahuate y extracto de la maceración de maíz con una cepa de *Candida sphaerica* (Sobrinho *et al.* 2008). En otro estudio similar, Oliveira *et al.* (2009), utilizaron residuos de aceite de palma y una cepa de *Pseudomonas alcaligenes* a nivel de matraz, para la producción de un biosurfactante. Ambos estudios se llevaron a cabo en Brasil. Nitschke & Pastore (2006), también estudiaron a nivel laboratorio, la producción de un biosurfactante a partir de la fermentación de las aguas residuales provenientes de la producción de harina de yuca, con una cepa *Bacillus subtilis* LB5a, el biosurfactante puede ser utilizado en una gran variedad de procesos.

En otro estudio realizado en Brasil, a nivel de laboratorio se utilizaron residuos de suero de leche y levadura de una destilería para producir ácido láctico por vía fermentativa con una cepa de *Lactobacillus curvatus* (Oliveira *et al.*, 1996).

Se reporta también la producción de metil-etil-ésteres, que pueden ser utilizados como aditivos de la gasolina, a partir de residuos municipales de alimentos por fermentación anaerobia utilizando las bacterias presentes en los residuos (Sans *et al.*, 1995); el residuo resultante del proceso fermentativo es útil como abono para suelos. El estudio realizado en España se llevó a cabo a nivel piloto.

Se mencionan también aquellos estudios donde mediante un proceso de fermentación se lleva a cabo la desintoxicación de los

residuos, para permitir un aprovechamiento posterior de éstos; por ejemplo: el desarrollo de *Pleurotus* en residuos provenientes de la extracción del aceite de oliva (Zervakis *et al.*, 1996) o la catálisis con enzimas de *Aspergillus niger* (Bouzid *et al.*, 2005), así como la digestión anaerobia de residuos de yuca con *Bacillus* sp. (Obeta *et al.*, 2007).

En Brasil, Loss *et al.* (2009), utilizaron los residuos provenientes del procesamiento del maíz en un cultivo a nivel piloto con una cepa de *Pleurotus* sp., para obtener un sustrato útil en la producción de setas comestibles.

Con residuos de cítricos y lodos resultantes de la industrialización de cítricos, con la cepa *Trichoderma harzianum* T-78, López *et al.* (2010) obtuvieron a nivel piloto, un bioplaguicida utilizado para el control de plagas en plantaciones de melón.

Entre algunos reportes novedosos está la producción de polihidroxibutirato, materia prima para la producción de plásticos biodegradables y elastómeros a partir de la fermentación de suero de queso con una cepa de *Methylobacterium* sp ZP24, a nivel piloto en un fermentador de 30 litros (Nath *et al.*, 2008). También se reporta la producción de polihidroxialcanoato, para los mismos fines, a partir de suero de queso con una cepa recombinante de *Cupriavidus necator*, a nivel de laboratorio (Povolo *et al.*, 2010); también a partir de una mezcla de suero de leche y lodos activados de una planta de tratamiento de aguas residuales de la industria lechera (Bosco & Chiampo, 2010).

En un estudio más reciente se reporta la producción de manganeso peroxidasa producida por *Lentinula edodes* a partir de la

fermentación sólida de residuos de eucalipto (Arantes *et al.*, 2011), la enzima es de gran importancia para la degradación de lignina.

RESIDUOS AGROINDUSTRIALES COMO SUSTRATO PARA LA GENERACIÓN DE BIOENERGÉTICOS

Los principales ejemplos de producción de bioenergéticos a partir de residuos agroindustriales reportados en la literatura, están enfocados hacia la producción de: bioetanol, biodiesel, otros biocombustibles, biohidrógeno y biogás. Para cada uno se hace referencia a los aspectos más relevantes.

Bioetanol

La historia del bioetanol en Brasil data desde 1903, según el Banco de Desarrollo de Brasil (BNDES, 2008), cuando se recomendó la implantación de una infraestructura para la producción de bioetanol automotor; las primeras pruebas formales sobre el funcionamiento de los vehículos se realizaron en 1920. Fue hasta 1931, que el gobierno brasileño determinó mediante decreto, la mezcla obligatoria de al menos un 5% de bioetanol anhidro con la gasolina, por lo que a partir de esa fecha se inició regularmente la producción industrial de éste. A partir de 1975, también mediante decreto el gobierno brasileño instituyó el Programa Nacional de Alcohol (Proálcool), con lo cual se aumentó sustantivamente la producción de bioetanol y se estimuló su uso en motores adaptados o producidos específicamente para su empleo al 100%. A partir de 1985, por razones económicas y políticas, se desincentivó la

fabricación de automotores a bioetanol y con ello la producción de éste; fue hasta el año 2000 que nuevamente repuntó esta actividad, cuando se estableció formalmente el uso de un mínimo porcentaje de bioetanol en la gasolina, que en los últimos años ha sido del 25%. En 2003 con el surgimiento de los automóviles “flex-fuel”, que tuvieron gran aceptación por parte del consumidor, se recuperó nuevamente la expansión de la industria del bioetanol en Brasil. La tecnología de ese tipo de vehículos permite elegir el combustible a utilizar, ya sea gasolina con 25% de bioetanol anhidro o bioetanol sólo, dependiendo del precio, disponibilidad del producto o desempeño del motor.

Así como en Brasil se produce bioetanol a partir de la sacarosa de la caña de azúcar, en los Estados Unidos se produce a escala comercial a partir del almidón del maíz. Dichas materias primas son fuente de alimentos para consumo humano y animal, por lo que es necesario contar con otras alternativas que no compitan con los cultivos alimenticios. Una de estas alternativas y tal vez la más importante, es el bagazo de caña, residuo de la industria azucarera, sin embargo, este material es de naturaleza química muy compleja y requiere ser tratado previamente para permitir su degradación (Carreón *et al.*, 2009).

El pretratamiento y la fermentación de materiales lignocelulósicos para la producción de bioetanol se ha practicado desde el siglo XIX en todo el mundo, pero solamente en los últimos 20 años se ha propuesto como materia prima para atender

el mercado de los biocombustibles. El principal componente de los residuos agroindustriales es la lignocelulosa, la cual está constituida por tres fracciones principales: celulosa (40-60%) que está protegida por hemicelulosa (20-40%) y por lignina (10-25%) (BNDES, 2008). La celulosa es un polímero lineal del dímero glucosa-glucosa con enlaces β -1,4 (celobiosa), su hidrólisis genera unidades de D-glucosa. La celulosa tiene una estructura muy cristalina, rígida y difícil de romper. La hemicelulosa es un heteropolisacárido que contiene 15% de hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) y 85% de pentosas (D-xilosa 75% y L-arabinosa 10%), además de ácidos metilglucurónico, galacturónico y glucurónico; la hemicelulosa es mucho más fácil de hidrolizar que la celulosa, pero la fermentación de las pentosas que genera no está muy desarrollada. La lignina es un heteropolímero amorfo ramificado de naturaleza fenólica con grupos metoxi y fenilpropánicos formado por alcoholes aromáticos como cumarílico, coniferílico y sinapílico (BDNES, 2008; Carreón *et al.*, 2009; Cuervo *et al.*, 2009).

En general, la primera etapa de pretratamiento de un residuo lignocelulósico para la producción de bioetanol es una molienda para aumentar la superficie de contacto y hacer más accesible el material. Después se pueden aplicar métodos físicos como la explosión con vapor y la termo-hidrólisis, o bien, métodos químicos como la hidrólisis ácida y alcalina. Existen también otros métodos combinados como la explosión

con amonio líquido (Afex) y la explosión con CO_2 .

A pesar de que los métodos de hidrólisis ácida son los más utilizados, son procesos complejos que tienen varias desventajas, entre ellas: que el desdoblamiento de celulosa a glucosa que puede provocar la descomposición de esta última, y en forma simultánea la hemicelulosa se desdobla a pentosas, situación que no es posible de controlar; al mismo tiempo, se forman los productos de la degradación de la lignina que son inhibitorios de la fermentación.

La hidrólisis enzimática, por lo general, se aplica una vez que los residuos han sido previamente tratados, para dejar las cadenas poliméricas más expuestas. Implica la acción de diferentes grupos de enzimas: las celulasas (endoglucanasas, celobiohidrolasas también llamadas exoglucanasas y β -glucosidasas); las hemicelulasas (endo-1,4- β -xilanasas, β -xilosidasa, α -L-arabinofurosidasa y α -glucuronidasa); además de β -manosidasa y β -galactosidasa, así como las fenol-oxidasas (peroxidasas y lacasas que actúan sobre los alcoholes fenólicos de la lignina). Los productos de reacción de las peroxidasas y lacasas, son tóxicos para los microorganismos etanologénicos, por lo que deben ser eliminados. Por el hecho de que la hidrólisis enzimática puede llevarse a cabo bajo condiciones moderadas, Takagi *et al.*, (1977) plantearon un “proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF)”, esta opción se ha visto como la mejor alternativa para la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos a un costo

competitivo a largo plazo (BNDES, 2008). De hecho, este método con frecuencia se cita en varias publicaciones, aunque pocos hacen referencia a los autores que lo desarrollaron y publicaron por primera vez en 1977.

En Brasil, desde 2003 se ha venido operando una planta con el proceso “Organosolv” combinado con el proceso patentado como “DHR (Dedini Hidrólisis Rápida)” (BNDES, 2008), que ha dado muy buenos resultados para el tratamiento de bagazo de caña de azúcar (Oliverio & Hilst, 2004; El Hage *et al.*, 2010). Al parecer, la aplicación de estos métodos más novedosos aún no se ha extendido a nivel mundial, pues pocos son los autores que hacen referencia a ellos. El BNDES (2008), refiere que “a pesar de no haber consenso sobre cuál sería la mejor opción tecnológica para la producción de bioetanol por las vías innovadoras, en todo el mundo los investigadores claman por la construcción de las primeras plantas comerciales que permitirán la obtención de las tan esperadas ganancias por el aprendizaje”.

En México, Aburto *et al.* (2008), llevaron a cabo una evaluación técnico - económica de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos, especialmente de bagazo de caña de azúcar mediante una simulación. Identificaron las operaciones unitarias que tienen mayor impacto en el proceso, que básicamente se refieren al pretratamiento del residuo para el cual consideraron: la ozonólisis (para incrementar la porosidad del material lignocelulósico que representa el 45% del residuo), seguida de la sacarificación (hidrólisis de lignina, celulosa,

hemicelulosa y pectina para transformar los polisacáridos en monosacáridos fermentables y evitar la formación de derivados de furfural que inhiben la actividad microbiana) para llegar a la fermentación (considerando que existen hexosas y pentosas). Concluyeron que para disminuir la inversión de capital y el costo de producción, cada uno de los procesos antes mencionados debe llevarse a cabo al 100%.

Si bien el residuo más utilizado para la producción de bioetanol es el bagazo de caña de azúcar, en la literatura se encontraron una gran variedad de residuos que se han estudiado en diversas partes del mundo para los mismos fines (no se citan las referencias), entre ellos:

- Aceite de palma y racimos libres de la fruta; pulpa, cáscara y tallo de la flor del plátano; mosto resultante de la elaboración de vinos; maíz y cortes de tallos de café, en Colombia.

- Salvado de trigo; cáscara de soja; árbol de las tulipas (*Liriodendrum tupilifera*); hojas de caña de azúcar; rastrojo de maíz; pasto varilla; astillas de madera de álamo y pasto perenne de *witchgrass*, en Estados Unidos de Norteamérica.

- Álamo; eucalipto; paja de trigo; sorgo; pasto perenne de *Brassica carinata*; algarrobo negro; mazorcas; cáscara de soja y planta de plátano, en España.

- Pasto; hojarasca; plantas acuáticas; hojas de caña de azúcar; avena, salvado de trigo, rastrojo de sorgo; mazorca de maíz, en la India.

- Residuos forestales de abeto; tubos de cartón y residuos de panificación, en Irán.
- Paja de arroz; residuos de la planta del plátano; mazorca de maíz en Egipto.
- Residuos de eucalipto; paja de arroz y abeto Douglas, en Japón.
- Tallos de maíz; residuos forestales de arce, álamo y abedul; mazorca de maíz, en China.
- Paja de cebada y pastos perennes de *Phleum pratense*, en Islandia.
- Paja de centeno, paja de colza (canola); paja de haba y ensilado de maíz; maíz, centeno y trébol, en Dinamarca.
- Paja de arroz, pasto elefante y pastos perennes de *Miscanthus flridulus*, en Taiwan.
- Mosto de la elaboración de vinos y remolacha azucarera, en Argentina.
- Paja de trigo, en Grecia.
- Paja y rastrojo de maíz, en Canadá.
- Pasto Bermuda y semilla de colza (canola), en Corea.
- Lodos de papel reciclado, en Portugal.
- Cáscara de fruta de palma, en Malasia.
- Álamo, en Italia.
- Paja de trigo, en Austria
- Celulosa de papel, en Suecia.

Biodiesel

El biodiesel es una mezcla de ácidos grasos de cadena larga y monoalquil-ésteres de alcoholes de cadena corta (metanol o etanol); el grupo éster incrementa el contenido de oxígeno en las mezclas de

diesel-biodiesel y mejora la eficiencia de combustión en motores a diesel. El proceso para la producción de biodiesel consiste en la transesterificación de aceites vegetales con alcoholes de bajo peso molecular como metanol o etanol; la reacción requiere una catálisis que puede ser ácida, alcalina o enzimática. La catálisis alcalina es la que se utiliza en el proceso a escala industrial, a pesar de que consume energía y genera subproductos indeseables difíciles de separar durante la purificación del biodiesel (Gog *et al.*, 2012).

La historia del biodiesel es también muy antigua, podría remontarse a 1893, cuando Rudolf Diesel, inventor del motor que lleva su nombre, corrió su primer modelo en Alemania utilizando aceite de cacahuate como combustible. En remembranza a este hecho, el 10 de agosto se declaró como el “día internacional del biodiesel”. El uso del aceite vegetal continuó hasta 1920, antes de que el diesel fósil desplazara del mercado a los aceites vegetales. De hecho el diseño del motor original tuvo que ser modificado para que pudiera operar con diesel fósil, debido a su menor viscosidad. Años más tarde, en 1937, un científico belga desarrolló un “procedimiento para la transformación de aceites vegetales para su uso como combustibles” protegido por una patente. En dicha patente, se propuso por primera vez el uso del término “biodiesel”. Cuarenta años después, en 1977, un científico brasileño aplicó para obtener la primera patente del “proceso para producción de biodiesel a escala industrial”. En 1979, en Sudáfrica se inició la investigación para la refinación de

aceite de girasol transesterificado con la finalidad de ajustarlo a los estándares del diesel. En 1987, una compañía austriaca estableció la primera planta piloto para la producción de biodiesel y en 1989 la primera planta industrial. En 2002 se publicó la norma ASTM D6751 con las especificaciones para biodiesel. En 2005 Minnesota, en Estados Unidos, estableció como mandato el utilizar 2% de biodiesel en todo el diesel que se vendiera en el estado; en ese mismo año, Filipinas decidió una acción similar, al establecer el uso de un 1% de biodiesel proveniente de aceite de coco en mezcla con diesel en los vehículos de uso oficial. También como parte de la historia, el proceso de transesterificación de un aceite vegetal, fue realizado por primera vez en 1853, por los científicos Duffy y Patrick (citado por Lin *et al.*, 2011).

A nivel mundial, Alemania es el principal productor de biodiesel; los aceites más utilizados son de semilla de colza (canola), soya, girasol y palma. Otras fuentes para la obtención de biodiesel son los aceites de: almendra, cebada, coco, copra, nuez, laurel, avena, salvado de arroz, ajonjolí (sésamo), sorgo y trigo, entre otros, pero debido a que todas estas materias primas son comestibles, se han buscado otras fuentes como: *jatropha* (piñón de tempate), *karanja* y *camelina* que son aceites no-comestibles, microalgas, además de residuos provenientes de: grasas animales incluyendo la del pescado, aceites gastados de la cocina y grasas de desechos de restaurantes (Lin *et al.*, 2011).

Las reacciones de transesterificación enzimática incluyen la conversión de

triglicéridos a diglicéridos y posteriormente a glicerol, se requiere la presencia de aceptores de los grupos acilo-, generalmente se utilizan alcoholes de cadena corta como metanol o etanol. Estas reacciones las llevan a cabo lipasas que tienen una excelente actividad y estabilidad en medios no-acuosos, sobre una amplia variedad de triglicéridos. Los principales microorganismos productores de lipasas extracelulares son: *Candida antartica*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizopus oryzae* y *Mucor meihei*; la desventaja de las lipasas extracelulares es el costo de separación y purificación del complejo enzimático. Entre las ventajas de las lipasas solubles, que incluyen las extracelulares y preparaciones comerciales, se pueden citar que el procedimiento de preparación es sencillo, pero pueden ser utilizadas una sola vez y después se inactivan principalmente por la presencia del alcohol aceptor de grupo acilo-. La inmovilización de las lipasas solubles permite que éstas sean reutilizadas, su estabilidad operacional y temperatura óptima aumentan las velocidades de conversión y con ello se acortan los tiempos de reacción. Por lo que respecta a las lipasas intracelulares, los principales microorganismos productores pertenecen a los géneros de *Aspergillus* y *Rhizopus*, algunas variedades se han inmovilizado; aunque los resultados han sido calificados como exitosos por las eficiencias de conversión, se tienen limitaciones en la transferencia de masa que constituyen un obstáculo para su desarrollo. Respecto al efecto inhibitorio del metanol o etanol sobre las lipasas, se han probado otros alcoholes y

además se han incluido disolventes orgánicos, cuya función es proteger a las lipasas de la desnaturalización derivada de la alta concentración de alcoholes, pero aún no se han podido superar las dificultades técnicas que han surgido (Gog *et al.*, 2012). Las investigaciones novedosas van enfocadas a la búsqueda de otras opciones tecnológicas para la transesterificación, entre las que se encuentran: el uso de fluidos supercríticos, el hidrotratamiento y el uso de óxidos de metales sólidos como estaño, magnesio y zinc (Helwani *et al.*, 2009). En virtud de que actualmente la producción industrial de biodiesel es dependiente de aceites vegetales comestibles, Atabani *et al.* (2012), hacen una revisión muy detallada de las ventajas y desventajas del biodiesel, así como de aspectos económicos y de desarrollo sustentable.

Un aspecto importante es que el proceso para la producción de biodiesel, genera residuos para los cuales se deben buscar alternativas de uso o tratamiento con la finalidad de completar su ciclo de vida.

Las microalgas de interés como materia prima para la elaboración de biodiesel son aquellas con altos contenidos de lípidos, que por lo general se sintetizan bajo condiciones de estrés según las condiciones de cultivo; entre las especies que se han reportado están: *Botryococcus brawnii*, *Chlorella*, *Cylindrotheca*, *Nannochloropsis*, *Nitzschia* y *Schizochytrium*, las cuales pueden producir aceites en una proporción tan alta como 75% del peso seco. En México, se ha venido realizando investigación en este tema, en el

CINVESTAV y el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Existen también algunas especies de levaduras y bacterias que producen aceites, entre las cuales se han reportado las siguientes: *Trichosporum fermentans*, *Lipomyces starkeyi*, *Mortierella isabellina* y *Cunninghamella echinilata*; el contenido máximo de aceites que producen es de 68% (Luque *et al.*, 2008). Los estudios sobre este tema son muy escasos.

OTROS BIOCOMBUSTIBLES

En relación a los combustibles de aviación, se produce a escala comercial el Bio-SPK (Bio- Synthetic Paraffinic Kerosene), algunas veces referido como HRJ (Hydroprocessed Renewable Jet), sintetizado generalmente a partir de grasas animales y aceites provenientes de algas, camelina, canola, coco, maíz y soya. El proceso de producción es de tipo químico, consta de dos pasos: primero una hidrogenación de los ésteres de ácidos grasos, seguida de una isomerización. El producto contiene en su mayoría parafinas ramificadas con un punto de ebullición bien definido para cumplir con los estándares de aviación, que son muy estrictos.

Por otra parte, Yusuf *et al.* (2011) hace referencia a una patente suiza para la producción de biometanol a partir de residuos, vía gasificación de licores negros a un costo competitivo, estos licores actualmente se utilizan para la producción de pulpa y papel.

Entre las pocas investigaciones a escala industrial que se han publicado sobre

biocombustibles está la producción de acetona-butanol, que llevó a cabo el Instituto Francés del Petróleo como parte del programa para Sustitución de Combustibles, mediante un proceso que involucra un pretratamiento por explosión con vapor del residuo lignocelulósico que en este caso fueron mazorcas y olotes, seguida de la hidrólisis enzimática con celulasas y la fermentación del hidrolizado con una cepa de *Clostridium acetobutylicum*, esta cepa es capaz de utilizar la xilosa y tiene una baja sensibilidad a los compuestos inhibidores de la fermentación que se producen durante el pretratamiento. La hidrólisis enzimática en lote se llevó a cabo en un reactor agitado de 25 m³ y la fermentación en reactores de 50 m³ (Marchal *et al.*, 1992).

Biohidrógeno

Entre los estudios reportados sobre producción de biohidrógeno a partir de residuos agroindustriales, están:

- La utilización de paja de arroz con los microorganismos presentes en el residuo (Chang *et al.*, 2011), por fermentación anaerobia a nivel de laboratorio en Taiwan.
- En México, se utilizaron vinazas provenientes de la elaboración del tequila en un reactor secuencial anaerobio de 7 litros operado en lote (Buitrón y Carvajal, 2010), los resultados demostraron la factibilidad del proceso sin necesidad de un tratamiento previo del residuo.
- Otro grupo de investigación en México, utilizó un hidrolizado ácido de paja de

avena rico en almidón en un reactor empacado operando en continuo a nivel laboratorio (Arriaga *et al.*, 2011). El mismo grupo realizó experimentos a nivel laboratorio utilizando suero de queso y un inóculo proveniente de un reactor anaerobio granular, en lote en viales serológicos de 120 ml (Dávila-Vázquez *et al.*, 2008a) y en continuo en un reactor agitado de 3 litros (Dávila-Vázquez *et al.*, 2009). También estudiaron la producción de biohidrógeno utilizando suero de queso y una cepa mejorada genéticamente de *Escherichia coli* en biorreactores de un litro (Rosales-Colunga *et al.*, 2010).

Dávila-Vázquez y Razo-Flores (2007), refieren que la producción de Bio-H₂ es altamente dependiente de las condiciones de fermentación como son: la naturaleza química y la concentración de sustrato, tipo de inóculo y tratamiento del mismo, el pH, los tiempos de retención y la presión parcial de hidrógeno, lo cual afecta el balance metabólico. De lo anterior concluyen que los retos a abordar son básicamente dos: 1) aumentar los rendimientos de producción, y 2) encontrar los procesos de recuperación de H₂ de los biorreactores; este último paso es crucial para la aplicación práctica del Bio-H₂ en las celdas de combustible para producir electricidad. En cuanto al análisis económico de la producción fermentativa biohidrógeno poco se ha reportado, Dávila-Vázquez *et al.* (2008b) identificaron dos principales barreras: el costo de fermentación para aumentar los rendimientos y el medio de cultivo. Para aumentar los rendimientos

mencionan el mejoramiento genético de los microorganismos y respecto al medio de cultivo establecen que los residuos agroindustriales representan una buena alternativa, sin embargo, su utilización para la producción de biocombustibles podría no satisfacer la demanda.

Biogás

Algunos ejemplos de producción de biogás como energético, son los siguientes:

- Un estudio de Grecia, realizado en reactores anaerobios, en el que utilizan aguas residuales provenientes de la producción de aceite de oliva, estiércol de vaca y suero de queso con las bacterias presentes en los residuos; el residuo resultante es útil como fertilizante, pero no se evaluaron sus características (Dareitoti *et al.*, 2009).
- A partir de residuos de industrialización de la papa y efluentes de una procesadora de papa en reactores anaerobios, con los microorganismos nativos (Parawira *et al.*, 2005). Del mismo grupo de investigación, y bajo las mismas condiciones, se reporta el uso de residuos de papa y remolacha azucarera (Parawira *et al.*, 2008); los estudios se llevaron a cabo en Zimbawue.
- Sandoval *et al.* (2009), estudiaron en Colombia la digestión anaerobia a nivel de reactores de residuos orgánicos urbanos, lodos de una planta de tratamiento y estiércol de cerdo; mencionan que el efluente se puede utilizar como biofertilizante.

INVESTIGACIONES EN MÉXICO SOBRE BIOENERGÉTICOS

A partir de las Memorias del XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería (2009) (www.smbb.com.mx), se identificaron las instituciones (en orden alfabético), que en México están realizando investigación relacionada con la producción de bioenergéticos, con énfasis en el aprovechamiento de residuos agroindustriales:

- Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Yautepec, Mor., Instituto Politécnico Nacional
- Centro de Investigación en Química Sustentable, Universidad Autónoma del Estado de México – Universidad Nacional Autónoma de México
- Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Guadalajara, Jal., Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
- Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Instituto Politécnico Nacional
- Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Unidad Michoacán, Instituto Politécnico Nacional
- Instituto de Biología, México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México
- Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, Mor., Universidad Nacional Autónoma de México

- Instituto de Ingeniería, Unidad Académica Juriquilla, Qro., Universidad Nacional Autónoma de México
- Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), San Luis Potosí, S.L.P., Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
- Instituto Tecnológico de Durango, Dgo.
- Instituto Tecnológico de Mérida, Yuc.
- Instituto Tecnológico de Zacatepec, Mor.
- Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI), Instituto Politécnico Nacional
- Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
- Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich.
- Universidad Politécnica de Chiapas, Chis.
- Universidad Politécnica de Pachuca, Hgo.

En el XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería (2011) (www.smbb.com.mx), se sumaron las siguientes instituciones:

- Centro de Investigación y Estudios Avanzados - Unidad Irapuato, Instituto Politécnico Nacional
- Instituto Tecnológico de Morelia, Mich.
- Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec
- Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI)
- Universidad Autónoma de Tlaxcala, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB)

- Universidad Iberoamericana
- Universidad Autónoma de Chihuahua
- Universidad Autónoma de Coahuila
- Universidad Autónoma del Estado de Morelos
- Universidad Autónoma de Querétaro
- Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa
- Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán.

MARCO REGULATORIO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL Y BIODIESEL EN MÉXICO

El marco regulatorio que se estableció en México a nivel federal para la producción de bioetanol y biodiesel, está conformado por la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos (2008) y su Reglamento (2009), el Acuerdo por el que se emiten los Lineamientos para el otorgamiento de permisos para la producción, el almacenamiento, el transporte y la comercialización de bioenergéticos del tipo etanol anhidro y biodiesel (2009), el Acuerdo por el que se emiten los formatos de solicitudes de permisos para la producción, el almacenamiento, el transporte y la comercialización de bioenergéticos del tipo etanol anhidro y biodiesel (2009), el Acuerdo mediante el cual se delega en el Subsecretario de Planeación Energética y Desarrollo Tecnológico, las facultades a que hace referencia el artículo 12 de la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos (2009) y el Decreto por el que se aprueba el Programa Especial para el Aprovechamiento

de Energías Renovables 2009-2012 (2009). Corresponde a la Dirección de Bioenergéticos de la Secretaría de Energía y a la Comisión Intersecretarial para el Desarrollo de los Bioenergéticos (donde intervienen las Secretarías de Energía; de Medio Ambiente y Recursos Naturales; de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; de Hacienda y Crédito Público, de Economía), vigilar que las acciones vayan encaminadas conforme a lo previsto. Como documentos oficiales de apoyo están: el Programa de Introducción de Bioenergéticos (Secretaría de Energía, 2008), Los Bioenergéticos en México (Comisión Intersecretarial para el Desarrollo de los Bioenergéticos, 2008), la Estrategia Intersecretarial de los Bioenergéticos (Comisión Intersecretarial para el Desarrollo de los Bioenergéticos, 2009) y Energías renovables para el desarrollo sustentable en México (Secretaría de Energía, 2009) que elaboró la Secretaría de Energía con la colaboración de GTZ (Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, actualmente GIZ).

USO Y DISPONIBILIDAD DE BIOCOMBUSTIBLES EN MÉXICO

La producción de bioetanol en México merece un análisis económico y estratégico muy riguroso, pues las evidencias de los últimos años indican que existen excedentes de azúcar y que en la mayor parte de los ingenios se produce alcohol de 96° para el mercado de bebidas y usos industriales, pero no para su uso como aditivo de las gasolinas (Becerra, 2010). No se ha revisado si la

tecnología de los automotores de combustión interna actuales permitiría el uso de mezclas de gasolina-etanol y en qué proporción, por lo que realmente todavía no existe una demanda para el bioetanol.

Respecto al biodiesel, en México ya se instaló la primera planta de producción de biodiesel en la zona industrial de Puerto Chiapas, y en Tuxtla Gutiérrez la primera surtidora de biodiesel al 100%, para que cada usuario decida el porcentaje a utilizar, que generalmente es 10% en mezcla con diesel fósil en automóviles. El transporte público de la región mezcla el 20% de biodiesel. El aceite que se utiliza como materia prima se extrae de diferentes fuentes: *Jatropha curcas*, palma, aceite vegetal usado que se recolecta en restaurantes y hoteles, así como sebo de rastros porcinos (www.chiapas.gob.mx).

Por otra parte, la paraestatal Aeropuertos y Servicios Auxiliares coordinó los esfuerzos para llevar a cabo el primer vuelo de demostración de un avión comercial en abril de 2011, con la ruta México - Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, este vuelo fue el séptimo en su tipo, a nivel mundial y el segundo en Latinoamérica. La materia prima que se utilizó fue la semilla de *Jatropha curcas*, la cual se obtuvo mediante donaciones de productores mexicanos de los estados de Chiapas, Yucatán, Michoacán y Puebla; se extrajo el aceite y se pre-refinó en Guadalajara; posteriormente, se trasladó a una bio-refinería en Pasadena, Texas, donde fue procesado. La composición del bioenergético utilizado fue 27% Bio SPK y 73% de turbosina fósil; el biocombustible se

alimentó solamente en uno de los motores del Airbus 320-214. En ese mismo año se llevaron a cabo otros dos vuelos con aviones Boeing partiendo de la Ciudad de México, uno con destino a San José de Costa Rica y otro a Madrid, en ambos el biocombustible contenía 25% Bio SPK y 75% turbosina fósil. A partir de julio de 2011, la especificación ASTM D 7566-11 oficializó la certificación del biocombustible de turbina (www.asa.gob.mx).

RESIDUOS AGROINDUSTRIALES COMO MEJORADORES O ACONDICIONADORES DE SUELOS OBTENIDOS MEDIANTE COMPOSTEO

La composta constituye un "grado medio" de descomposición de la materia orgánica, en la que no interviene la mano del hombre, el reciclaje es 100% natural, participan los microorganismos presentes en los residuos. La elaboración de composta, composteo o compostaje, es una técnica ancestral muy utilizada para la estabilización de residuos, el producto obtenido es rico en los nutrientes necesarios para abonar las tierras de cultivo. En los siguientes párrafos se presentan algunos ejemplos de la elaboración de composta a partir de residuos agroindustriales:

Residuos de la producción de cerveza fueron sometidos a composteo a nivel piloto, la composta resultante fue probada en dos tipos de suelo diferentes donde se sembró maíz (Mbagwu & Ekwealor, 1990).

Baca *et al.* (1992) transformaron en composta los residuos provenientes del proceso de cardado del algodón, a nivel

piloto en pilas aireadas mediante volteo y ventilación.

García *et al.* (2002) llevaron a cabo un estudio a nivel piloto, para el composteo de residuos de levadura y malta de la industria cervecera, podas de árboles y hojas de olivo. El producto resultante fue utilizado para producción de plantas ornamentales de caléndula y como composta comercial.

A partir de residuos municipales orgánicos, residuos de cultivos y lodos de tratamiento de aguas residuales en la Isla de Creta (Grecia), Manios (2004) obtuvo, a nivel piloto, una composta útil para el enriquecimiento de suelos. Con un enfoque similar, Madejón *et al.* (2001), utilizaron residuos de vinazas de la industria azucarera y desechos municipales orgánicos; así mismo, Sánchez *et al.* (2008) utilizando residuos de la extracción de aceite de oliva, estiércol de oveja, paja de corrales de ganado y tallos de uvas en diferentes proporciones, obtuvieron a nivel piloto en España, una composta que fue mezclada con un suelo para evaluar la permanencia del carbono en el suelo.

Ribeiro *et al.* (2007), reportaron el composteo a nivel piloto, de residuos forestales y estiércol de cerdo en pilas aireadas, para obtener un sustrato útil para la producción de plántulas de tomate y lechuga, en Portugal. Otros ejemplos similares son: el estudio de Benito *et al.* (2005) quienes prepararon composta a partir de residuos de la poda de hierbas y hojas, así como los de Bustamante *et al.* (2008a, 2008b) quienes sometieron a composteo el orujo de uva con

estiércol de ganado vacuno y de aves de corral.

Tosun *et al.* (2008) reportaron el compostaje de residuos provenientes de la extracción de aceite de rosas y residuos sólidos municipales en reactores discontinuos de 65 litros, el producto obtenido se utilizó como fertilizante.

En España, mediante composteo de residuos sólidos municipales y los microorganismos autóctonos, Herrera *et al.* (2008), obtuvieron a nivel piloto un fertilizante orgánico que fue utilizado para el cultivo de jitomates. En otro estudio similar, Ostos *et al.* (2008), sometieron a composteo residuos de poda, residuos orgánicos municipales y lodos de una planta de tratamiento para obtener una composta de vivero, donde se pudo apreciar el crecimiento del arbusto *Pistacia lentiscus*, que produce una goma aromática. También se reportó el composteo a nivel piloto, de residuos provenientes de la extracción del aceite de olivo, restos de poda de olivos, estiércol de oveja y de caballo, con adición de urea; la degradación de la materia orgánica fue llevada a cabo por la flora microbiana presente en los residuos. Utilizando diferentes proporciones de cada uno de los residuos se dio seguimiento al contenido de gases generados en el proceso: bióxido de carbono, metano y óxido nitroso, con la finalidad de identificar la proporción de éstos que genera las más bajas emisiones de gases de efecto invernadero (Sánchez *et al.*, 2010).

RESIDUOS AGROINDUSTRIALES COMO SUPLEMENTO ALIMENTICIO PARA

PARA ANIMALES

En tiempos de crisis económicas, el aumento de precios de los cereales obliga a buscar alternativas de alimentación para el ganado que sean más económicas y rindan los mismos resultados que los cereales. El aspecto más importante de los materiales de sustitución es el valor nutricional que está conformado por tres características:

a) El contenido de humedad, debe ser entre 15 y 30% (base seca), esto condiciona el método de conservación y el costo del transporte.

b) El valor proteico, que en general es relativamente elevado en verduras como la alcachofa y bajo en frutas.

c) Tipo de fibra y su contenido en el material; si el alimento va a ser destinado a rumiantes debe tener alto valor energético; en el caso de animales monogástricos la fibra proveniente de frutas es fácilmente fermentable y tiene un efecto prebiótico.

Si la composición satisface las necesidades, la siguiente discusión incluye un análisis de costos por unidad de energía y costo por unidad de peso del alimento tradicional comparado con la nueva formulación que incluye el subproducto o residuos que se pretende utilizar.

Lo anterior lleva a toda una investigación que incluye: el análisis de la composición química, la decisión de los animales destino y la capacidad de utilización. Los parámetros a considerar para la toma de decisiones que en el campo de alimentación animal están bien definidos son: índices productivos, salud intestinal, efectos sobre el rendimiento y la calidad del producto final (en caso de leche y

quesos), así como la composición del estiércol.

Entre los reportes encontrados en la literatura sobre el tema está el estudio de Erdman & Reddy (1987) quienes produjeron un alimento para rumiantes rico en nitrógeno, mediante la fermentación de desechos de aves de corral, cerdos, ganado de engorda y suero de queso con los microorganismos presentes en los residuos.

Como ejemplo de estudios enfocados a la producción de proteína unicelular para el enriquecimiento de alimentos balanceados para animales están: la fermentación de residuos de vaina y pulpa de calabaza con *Saccharomyces cerevisiae* (Essien *et al.*, 1992) y la fermentación del bagazo de caña de azúcar con *Candida tropicalis* (Pessoa *et al.*, 1996).

También se cita el estudio de Kaur & Saxena (2004), quienes generaron un alimento para peces, al mezclar residuos de malta provenientes de la fabricación de la cerveza con desechos de aves de corral y estiércol de vacas.

MARCO REGULATORIO SOBRE RESIDUOS COMO CONTAMINANTES DEL MEDIO AMBIENTE

El marco regulatorio en México enfocado al problema de residuos lo conforma la Ley General de Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR), publicada en el Diario Oficial de la Federación el 08 de octubre de 2003. Sus disposiciones tienen por objeto garantizar el derecho a toda persona a un medio ambiente adecuado y propiciar el desarrollo sustentable a través de

la prevención de la generación, la valorización y la gestión integral de los residuos peligrosos, residuos sólidos urbanos y residuos de manejo especial; así como prevenir la contaminación de sitios por la disposición de residuos y llevar a cabo su remediación.

Los residuos generados por actividades pesqueras, agrícolas, forestales, avícolas, ganaderas, incluyendo los residuos de los insumos utilizados en estas actividades, la LGPGIR los clasifica como residuos de manejo especial (artículo 19, fracción III). Los cuales están definidos como aquellos generados en los procesos productivos que no reúnen las características para ser considerados como peligrosos o como residuos sólidos urbanos (artículo 5 fracción XXX). La LGPGIR, como base del marco regulatorio en materia de residuos incluye también aspectos importantes, como el aprovechamiento de residuos (artículo 5 fracción II), el manejo integral (artículo 5 fracción XVII), el plan de manejo (artículo 5 fracción XXI) y la valorización (artículo 5 fracción XLIV).

A partir de lo anterior, se puede establecer que México cuenta con un marco legal a nivel federal para el aprovechamiento de residuos agroindustriales, lo que hace falta es crear las normas ambientales correspondientes, así como las leyes estatales para el manejo de los residuos.

En países de Centro y Sudamérica, la problemática de los residuos es el resultado de un incremento en la capacidad de producción que a su vez está ligada a un aumento en la generación de subproductos y

residuos, además del surgimiento de leyes ambientales cada vez más estrictas, lo cual ha llevado a la necesidad de gestionar residuos o buscar alternativas para su eliminación.

Respecto a las políticas internacionales aplicables al tema, es importante mencionar que un proceso biotecnológico que se pretende implementar para el aprovechamiento de un subproducto o residuo deberá ser menos contaminante que aquel que le dio origen, según las políticas establecidas en la norma NMX-SAST-004-IMNC-2004 que se refiere al sistema de administración de responsabilidad social.

Por otra parte, al considerar el aprovechamiento de un subproducto o residuo como materia prima, con fines de evitar un daño al ambiente, el proceso deberá cumplir con los requisitos establecidos en la norma NMX-SAA-14020-IMNC-2004, que refiere a un producto “verde” como aquel que se haya producido a partir del uso eficiente de la energía, del agua, así como de los diferentes insumos o materias primas; que el material pueda ser reciclado o reutilizable; que los desechos sean susceptibles de ser tratados mediante composteo y que sea biodegradable. Los atributos ambientales de los productos finales deberán ser consistentes con las expectativas de los productores y los consumidores o usuarios.

ASPECTOS DE CONTAMINACIÓN DE SUELO Y SUBSUELO POR PRESENCIA DE RESIDUOS

Cuando los residuos agroindustriales son dispuestos sobre el suelo sin ningún tratamiento previo y permanecen a la intemperie, su descomposición los puede convertir en residuos peligrosos principalmente por la presencia de agentes infecciosos, por el daño que pudieran causar a humanos, animales y a los recursos naturales. Si no se aplicaron medidas de remediación oportunamente el problema de contaminación se convierte en un pasivo ambiental y como consecuencia se puede presentar la dispersión de contaminantes. Al respecto, el Reglamento de la LGPGIR, en su artículo 132 establece la obligación de remediar un sitio contaminado. La vigilancia del cumplimiento de estos instrumentos regulatorios en México, es realizado por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

Los problemas de dispersión de contaminantes derivados de la disposición de residuos a la intemperie pueden afectar directamente a los recursos naturales: suelo, agua y aire, además de plantas y animales de los alrededores. El daño que pudieran ocasionar dichos residuos está en función de sus características físicas, químicas y biológicas. Si el residuo contiene carbohidratos, los microorganismos propios del suelo y aquellos presentes de manera natural en el residuo iniciarán su degradación, si por el proceso microbiano que se inicia se generan lixiviados, éstos migrarán en forma vertical hacia el subsuelo y podrían alcanzar los mantos acuíferos; además, los microorganismos presentes podrían ser arrastrados por las corrientes de

aire para ser depositados en otros sitios. Si la degradación natural que se inicia es promovida por bacterias anaerobias pudieran generarse malos olores.

TRATAMIENTO DE DESECHOS

Cuando en un sitio se estuvieron depositando por mucho tiempo subproductos o residuos agroindustriales que no fueron aprovechados en su momento y que por lo tanto ya perdieron sus cualidades, éstos se convierten en desechos. Si el material tiene cierto contenido de materia orgánica, pero prevalecen condiciones insalubres, será mejor estabilizar el material como si se tratara de biosólidos y considerar su aprovechamiento como mejoradores o acondicionadores de suelos. Si este fuera el caso y previo acuerdo con la autoridad ambiental, se podría adoptar la norma oficial mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002 para definir los límites máximos permisibles de contaminantes, que básicamente incluyen metales (arsénico, cadmio, cromo, cobre, plomo, mercurio, níquel y zinc), así como patógenos (coliformes fecales y *Salmonella*) y parásitos (huevos de helminto). Si el desecho ya no es susceptible de ningún aprovechamiento entonces procede su disposición final en un sitio controlado que cumpla con las especificaciones que establece la norma oficial mexicana NOM-083-SEMARNAT-2003.

Si no existen condiciones insalubres en el desecho y éste todavía contiene materiales susceptibles de ser utilizados, se puede proceder a la aplicación de hongos, particularmente de los géneros *Thricoderma*,

Phanerochaete y *Pleurotus*, que produzcan enzimas extracelulares como: celulasas, beta-glucosidasas, peroxidasas y lacasas, que sean capaces de degradar los sustratos complejos bajo las condiciones que prevalecen en el sitio, considerando que el material se encuentra en forma semisólida sobre el suelo y a la intemperie, por lo tanto está expuesto a condiciones no controladas que pudieran llegar a ser extremas como los cambios día/noche, calor/frío, sol/lluvia. Un aspecto adicional es que independientemente del tratamiento que se aplique, los costos deberán ser mínimos, por el hecho de que no se va a generar algún producto con valor agregado, solamente son acciones de protección ambiental. Una vez tratado el material se podrá utilizar como mejorador o acondicionador de suelos.

BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS QUE FUERON CONTAMINADOS POR LA DISPOSICIÓN DE DESECHOS AGROINDUSTRIALES

Para proceder con la biorremediación de un suelo que fue contaminado por la disposición de subproductos, residuos o desechos agroindustriales, primeramente se deberá hacer un estudio de caracterización del sitio, para identificar los recursos naturales que fueron afectados, determinar la magnitud del daño y evaluar el riesgo que constituye el problema de contaminación. Será necesario conocer las características de los materiales que fueron depositados, sus componentes principales y los detalles del proceso que los generó para definir los parámetros indicadores que deberán ser

analizados. Aunque no existe en México un marco normativo específico para este tipo de contaminación, se pueden tomar como base diferentes documentos normativos y el criterio de experto, a partir de lo cual serían considerados los siguientes parámetros:

- Parámetros químicos
 - o pH.
 - o Compuestos orgánicos: plaguicidas en general, bifenilos policlorados, dioxinas/furanos, compuestos aromáticos polinucleares.
 - o Metales pesados en el material sólido: arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y vanadio.
 - o Compuestos lixiviables: nitrógeno amoniacal, nitritos/nitratos, cloruros, materia orgánica disuelta, sustancias activas al azul de metileno (este último para cuantificar presencia de surfactantes), además de los mismos metales pesados que se enlistaron en el punto anterior.
- Parámetros biológicos
 - o Microorganismos patógenos a humanos y animales
 - o Huevos de helminto

Una vez definidos los parámetros por analizar será necesario elaborar un plan de muestreo para definir la distribución de los puntos de muestreo en el plano horizontal, obtener muestras de suelo a diferentes profundidades y si existe un manto freático, norias o pozos en los alrededores, obtener también muestras de agua subterránea para

identificar la presencia de los compuestos lixiviables. De todos los parámetros referidos solamente existen valores de referencia para el pH (NOM-021-SEMARNAT-2000), para los bifenilos policlorados (NOM-133-SEMARNAT-2000), para algunos compuestos aromáticos polinucleares (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003) y para los metales (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2007), sin embargo, éstos podrán ser utilizados previo acuerdo con la autoridad ambiental. Otra opción que también puede resultar de un acuerdo con la autoridad ambiental es realizar una evaluación de riesgo a la salud y al ambiente, estableciendo criterios propios en función de las particularidades del sitio.

Lo que se espera del estudio de caracterización es tener una "radiografía" del sitio que permita interpretar en forma tridimensional, la magnitud de la afectación y el tipo de contaminantes presentes, a partir de esto se podrán determinar las alternativas de tratamiento que se pueden aplicar al suelo y en su caso, al agua subterránea.

CONSIDERACIONES FINALES

Tomando como marco de referencia los conceptos de sostenibilidad que se manejan a nivel internacional, los estudios que se realicen y las biotecnologías que se desarrollen deberán haber evaluado el impacto ambiental de todos los residuos, los que se reutilicen en forma directa como materia prima, o bien, los que se generen de la extracción de la materia prima, así como

aquellos resultantes de todas y cada una de las operaciones involucradas. Para evaluar el impacto ambiental se deberán considerar todos los insumos y servicios que se requieren y sus características para identificar los recursos naturales que se verían afectados, es decir, suelo, agua y aire. También se deberán identificar los residuos que pueden ser reutilizados y los que requieren un manejo o tratamiento específico para su disposición final. La metodología para dicha evaluación es conocida a nivel internacional como “análisis de ciclo de vida”, los principios generales de aplicación están establecidos en la serie de normas ISO 14040:1997, que forman parte de los estándares enfocados a la administración o gestión ambiental. Sólo de esta manera se podrá asegurar que el manejo de residuos se hará en forma sostenible.

De la revisión realizada, se puede establecer que la mayor parte de los estudios biotecnológicos para el aprovechamiento de residuos se queda a nivel de laboratorio, no se experimenta el escalamiento, ni la separación o recuperación del producto. Es muy importante considerar estas operaciones para poder visualizar un esquema completo del proceso que se pretende desarrollar y con ello identificar los impactos ambientales de los residuos provenientes de cada parte de un proceso.

En el tema de biocombustibles, es importante mencionar la necesidad de hacer un análisis riguroso y profundo sobre el enfoque que se debe dar a las investigaciones, primero, para no caer en el error de utilizar como materia prima cultivos

que compitan con alimentos (Viniegra, 2008), que demanden agua, que consuman energía y que generen más residuos; y segundo, considerar que si ya se tiene un camino recorrido que se refleja por el sinnúmero de publicaciones que circulan a nivel mundial, cualquier esfuerzo que se realice debe partir de los avances actuales, pero no de cero, no vale la pena repetir experiencias que no condujeron al éxito. Como especialistas, debemos demostrar que para el caso de México los esfuerzos deben ir dirigidos hacia el aprovechamiento de residuos lignocelulósicos en general (Martínez, 2010) y de residuos orgánicos de origen urbano (Saucedo, 2010), además de integrar biotecnólogos experimentados en todas las acciones gubernamentales y voluntades políticas que se pretendan emprender. Vale la pena leer y analizar la literatura oficial que conforma el marco regulatorio para la producción de biocombustibles en México.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Lic. Guillermina Sánchez su apoyo para tener el acceso a las bases de datos, a la Q.F.B. Lorena Vilchis Rodríguez su participación activa en la revisión de los artículos de donde se extrajo la información y a la M. en C. Diana García Aguirre por su apoyo en la revisión del escrito.

REFERENCIAS

- Abdel-Sater M A & El-Said A H M (2001)
Xylan-decomposing fungi and
xylanolytic activity in agricultural and

- industrial wastes. *Int. Biodegrad. Biodegrad.* 47(1): 15-21.
- Aburto J, Martínez T & Murrieta F (2008) Evaluación técnico-económica de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)* 23(1): 23-30.
- Acuerdo por el que se emiten los Lineamientos para el otorgamiento de permisos para la producción, el almacenamiento, el transporte y la comercialización de bioenergéticos del tipo etanol anhidro y biodiesel. Diario Oficial de la Federación, 13 de noviembre de 2009, 25 pp.
- Acuerdo por el que se emiten los formatos de solicitudes de permisos para la producción, el almacenamiento, el transporte y la comercialización de bioenergéticos del tipo etanol anhidro y biodiesel. Diario Oficial de la Federación, 13 de noviembre de 2009, 12 pp.
- Acuerdo mediante el cual se delega en el Subsecretario de Planeación Energética y Desarrollo Tecnológico, las facultades a que hace referencia el artículo 12 de la ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos. Diario Oficial de la Federación, 20 de marzo de 2009, 3 pp.
- Arantes V, Silva E M & Milagres A M F (2011) Optimal recovery process conditions for manganese peroxidase obtained by solid-state fermentation of eucalyptus residue using *Lentinula edodes*. *Biomass and Bioenergy* 35(9): 4040-4044.
- Arriaga S, Rosas I, Alatraste-Mondragón F & Razo-Flores E (2011) Continuous production of hydrogen from oat Straw hydrolysate in a biotrickling filter. *Int. J. Hydrogen Energy* 36: 3442-3449.
- Atabani A E, Silitonga A S, Badruddin I A, Mahlia T M I, Masjuki H H & Mekhilef S (2012) A comprehensive review on diesel as an alternative energy resource and its characteristics *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16: 2070-2093.
- Baca M T, Fornasier F & de Nobili M (1992) Mineralization and humification pathways in two composting processes applied to cotton wastes. *J. Ferment. Bioeng.* 74(3): 179-184.
- Becerra P L A (2010) La industria del etanol en México. *Economía UNAM* 16(6): 82-98.
- Benito M, Masaguer A, De Antonio R & Moliner A (2005) Use of pruning waste compost as a component in soilless growing media. *Biores. Technol.* 96(5): 597-603.
- Blancas A, Alpizar L, Larios G, Saval S & Huitron C (1982) Conversion of henequen pulp to microbial biomass by submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 12: 171-175.
- BNDES (Banco Nacional de Desenvolvimento Económico e Social) (2008) Bioetanol de caña de azúcar: energía para el desarrollo sostenible, 320 p.

- Bosco F & Chiampo F (2010) Production of polyhydroxyalcanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge. Production of bioplastics using dairy residues. *J. Biosci. Bioeng.* 109(4): 418-421.
- Botella C, Ory I, Webb C, Cantero D & Blandino A (2005) Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochem. Eng. J.* 26(2-3): 100-106.
- Bouazid O, Navarro D, Roche M, Asther M, Haon M, Delattre M, Lorquin J, Labat M, Asther M & Lesage-Meessen L (2005) Fungal enzymes as a powerful tool to release simple phenolic compounds from olive oil by-product. *Proc. Biochem.* 40(5): 1855-1862.
- Buitrón G & Carvajal C (2010) Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Biores. Technol.* 101: 9071-9077.
- Bustamante M A, Paredes C, Moral R, Agulló E, Pérez-Murcia M D & Abad M (2008a) Composts from distillery wastes as peat substitutes for transplant production. *Res. Conserv. Recycl.* 52(5): 792-799.
- Bustamante M A, Paredes C, Marhuenda-Egea F C, Pérez-Espinosa A, Bernal M P & Moral R (2008b). Co-composting of distillery wastes with animal manures: Carbon and nitrogen transformations in the evaluation of compost stability. *Chemosphere* 72(4): 551-557.
- Carreón R O E, Sabido R L A, Centeno L S, Leal R L J, Martínez J A & Fernández S M T (2009) Etanol carburante. *BioTecnología* 13(3): 79-102.
- Castilho L R, Medronho R A & Alves T L M (2000) Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Biores. Technol.* 71(1): 45-50.
- Castro C, Zuluaga R, Putaux J C, Caro G, Mondragon I & Gañán P (2011) Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. *Carboh. Polym.* 84(1): 96-102.
- Chang A C C, Ying-Hsuan T, Ming-Hsiang H, Chyi-How L & Chiu-Yue L (2011) Hydrogen production by the anaerobic fermentation from acid hydrolyzed rice straw hydrolysate. *Int. J. Hydrogen Energy* 36(21): 14280-14288.
- Comisión Intersecretarial para el Desarrollo de los Bioenergéticos (2008) Los Bioenergéticos en México, SENER, SEMARNAT, SAGARPA, SHCP, SE, 13 pp.
- Comisión Intersecretarial para el Desarrollo de los Bioenergéticos (2009) Estrategia Intersecretarial de los Bienergéticos, SENER,

- SEMARNAT, SAGARPA, SHCP, SE, 29 pp.
- Cuervo L, Folch J L & Quiroz R E (2009) Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología* 13(3): 11-25.
- Decreto por el cual se aprueba el Programa Especial para el Aprovechamiento de Energías Renovables 2009-2012. Diario Oficial de la Federación, 06 de agosto de 2009, pp 10-57.
- Dareioti M A, Dokianakis S N, Stamatelatos K, Zafiri C & Kornaros M (2009) Biogas production from anaerobic co-digestion of agroindustrial wastewaters under mesophilic conditions in a two-stage process. *Desalination* 248(1-3): 891-906.
- Dávila-Vázquez G, Alatraste-Mondragón F, de Leon-Rodríguez A & Razo-Flores E (2008a) Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *Int. J. Hydrogen Energy* 33: 4989-4997.
- Dávila-Vázquez G, Arriaga S, Alatraste-Mondragón F, De León-Rodríguez A, Rosales-Colunga L M & Razo-Flores E (2008b) Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7: 27-45.
- Dávila-Vázquez G, Cota-Navarro C B, Rosales-Colunga L M, de Leon-Rodríguez A & Razo-Flores E (2009) Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *Int. J. Hydrogen Energy* 34: 4296-4304.
- Dávila-Vázquez G & Razo-Flores E (2007) Producción biológica de hidrógeno por vía fermentativa: Fundamentos y perspectivas. *BioTecnología* 11(3): 19-27.
- Erdman M D & Reddy C A (1987) Batch fermentation of cheese-whey supplemented poultry, swine and cattle waste filtrates. *Biol. Wastes* 22(1): 23-37.
- El Hage R, Chrusciel L, Desharnais L & Brosse N (2010) Effect of autolysis of *Miscanthus x giganteus* on lignin structure and organosolv delignification. *Biores. Technol.* 101(23): 9321-9329.
- Essien A I, Ebana R U B & Udo H B (1992) Chemical evaluation of the pod and of the fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*) fruit. *Food Chem.* 45(3): 175-178.
- Fanchini C R, Temer B, Teixeira M C & Cano E (2010) Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. *Biores. Technol.* 101(11): 4139-4143.
- García-Gómez A, Bernal M P & Roig A (2002) Growth of ornamental plants in two composts prepared from agroindustrial wastes. *Biores. Technol.* 83(2): 81-87.
- Godoy M G, Gutarra M L E, Maciel F M, Felix S P, Bevilacqua J V, Machado O L T & Freire D M G (2009) Use of a

- low-cost methodology for biodegradation of castor bean waste and lipase production. *Enz. Microb. Technol.* 44(5): 317-322.
- Gog A, Roman M, Tosa M, Paizs C & Irimie (2012) Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. *Renewable Energy* 39: 10-16.
- Guimarães L H, Terenzi H F, Teixeira M L & Atílio J J (2007) Production and characterization of a thermostable extracellular D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. *Enz. Microb. Technol.* 42(1): 52-57.
- Helwani Z, Othman M R, Aziz N, Fernando W J N & Kim J (2009) Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review. *Fuel Process. Technol.* 90: 1502-1514.
- Herrera F, Castillo J E, Chica A F & López Bellido L (2008) Use of municipal solid waste compost (MSWC) as a growing medium in the nursery production of tomato plants. *Biores. Technol.* 99(2): 287-296.
- Huitrón C, Saval S & Acuña M E (1984) Production of microbial enzymes from agro-industrial by-products. *Enz. Eng.* 7: 110-114.
- ISO 14040:1997. Environmental management–Life cycle assessment –Goal and scope definition and inventory analysis. International Standard Organization.
- Kaur V I & Saxena P K (2004) Incorporation of brewery waste in supplementary feed and its impact on growth in some carps. *Biores. Technol.* 91(1): 101-104.
- Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos (2008). Diario Oficial de la Federación, 01 de febrero de 2008, 10 pp.
- Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) (2007). Diario Oficial de la Federación, 08 de octubre de 2003, última reforma publicada en el Diario Oficial de la Federación el 19 de junio de 2007, 42 pp.
- Lin L, Cunshan Z, Vittayapadung S, Xiangqian S & Mingdong D (2011) Opportunities and Challenges for biodiesel fuel. *App. Energy* 88: 1020-1031.
- Lopez-Mondejar R, Bernal-Vicente A, Ros M, Tittarelli F, Canali S, Intrigliolo F & Pascual J A (2010) Utilisation of citrus compost-based growing media amended with *Trichoderma harzianum* T-78 in *Cucumis melo* L. seedling production. *Biores. Technol.* 101(10): 3718-3723.
- Loss E, Royer A R, Barreto-Rodrigues M & Barana A C (2009) Use of maize wastewater for the cultivation of the *Pleurotus* spp. mushroom and optimization of its biological efficiency. *J. Haz. Mat.* 166(2-3): 1522-1525.
- Luque R, Herrero-Avila L, Campelo J M, Clark J H, Hidalgo J M, Luna D,

- Marinas J M & Romero A A (2008). Biofuels: a technological perspective. *Energy & Environ. Sci.* 1(5): 513-596.
- Madejón E, López R, Murillo J M & Cabrera F (2001) Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). *Agric. Ecosyst. Environ.* 84(1): 55-65.
- Manios (2004) The composting potential of different organic solid wastes: experience from the island of Crete. *Environ. Int.* 29(8): 1079-1089.
- Marchal R, Ropars M, Pourquié J, Fayolle F & Vandecasteele JP (1992) Large-Scale Enzymatic Hydrolysis of Agricultural Lignocellulosic Biomass. Part 2: Conversion into Acetone-Butanol. *Biores. Technol.* 42: 205-217.
- Martínez J A (2010) Las futuras refinerías están basadas en procesos biotecnológicos. *BioTecnología* 14(3): 4-5.
- Mbagwu J S C & Ekwealor G C (1990) Agronomic potential of brewers' spent grains. *Biol. Wastes* 34(4): 335-347.
- Mussatto S I, Aguilar C N, Rodrigues L R & Teixeira J A (2009) Fructo-oligosaccharides and B-fructo-furanosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* 59(1-3): 76-81.
- Nath A, Dixit M, Bandiya A, Chavda S & Desai A J (2008) Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp ZP24. *Biores. Technol.* 99(13): 5749-5755.
- Nitschke M & Pastore G M (2006) Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Biores. Technol.* 97(2): 336-341.
- NMX-SAST-004-IMNC-2004. Norma Mexicana "Sistema de Administración de Responsabilidad Social para todos los procesos fundamentales de la empresa que incluyen Dirección, Realización, Gestión de Recursos, Comunicación, Medición, Análisis y mejora".
- NMX-SAA-14020-IMNC-2004. Norma Mexicana "Etiquetas y declaraciones ambientales – principios generales".
- Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002 (2003) Protección ambiental.- Lodos y biosólidos.- Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. Diario Oficial de la Federación, 15 de agosto de 2003, pp 18-60.
- Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 (2002) Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación, 31 de diciembre de 2002, pp 1-85.
- Norma Oficial Mexicana NOM-083-SEMARNAT-2003 (2004) Especificaciones de protección

- ambiental para la selección del sitio, diseño, construcción, operación, monitoreo, clausura y obras complementarias de un sitio de disposición final de residuos sólidos urbanos y de manejo especial. *Diario Oficial de la Federación*, 20 de octubre de 2004, pp 1-16.
- Norma Oficial Mexicana NOM-133-SEMARNAT-2000 (2001) Protección Ambiental - Bifenilos policlorados (BPCs) - Especificaciones de manejo. *Diario Oficial de la Federación*, 10 de diciembre de 2001.
- Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (2005) Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. *Diario Oficial de la Federación*, 30 de marzo de 2005, pp 25-43.
- Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 (2007) Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. *Diario Oficial de la Federación*, 02 de marzo de 2007.
- Obeta U J, Harvey L M & McNeil B (2007) Linamarase activities in *Bacillus* spp. responsible for thermophilic aerobic digestion of agricultural wastes for animal nutrition. *Waste Management* 27(11): 1501-1508.
- Oliveira A S, Gomez R J H C & Haully M C O (1996) Lactic acid production by biodegradation of agroindustrial residues. *Int. Biodeter. Biodeg.* 37(1-2): 113.
- Oliveira L A, Porto A L F & Tambourgi E B (2006) Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Biores. Technol.* 97(6): 862-867.
- Oliveira F J S, Vazquez L, Campos N P & França F P (2009) Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. *Proc. Biochem.* 44(4): 383-389.
- Oliverio J L & Hilst A G P (2004) DHR – Dedini Rapid Hydrolysis Revolutionary process for producing alcohol from sugarcane bagasse. *Int. Sugar J.* 106: 169-171.
- Ostos J C, López-Garrido R, Murillo J M & López R (2008) Substitution of peat for municipal solid waste- and sewage sludge-based composts in nursery growing media: Effects on growth and nutrition of the native shrub *Pistacia lentiscus* L. *Biores. Technol.* 99(6): 1793-1800.
- Parawira W, Murto M, Read J S & Mattiasson B (2005) Profile of hydrolases and biogas production during two-stage mesophilic anaerobic digestion of solid potato waste. *Proc. Biochem.* 40(9): 2945-2952.

- Parawira W, Read J S, Mattiasson B & Björnsson L (2008) Energy production from agricultural residues: High methane yields in pilot-scale two-stage anaerobic digestion. *Biomass Bioenergy* 32(1): 44-50.
- Pessoa Jr A, Mancilha I M & Sato S (1996). Cultivation of *Candida tropicalis* in sugar cane hemicellulosic hydrolyzate for microbial protein production. *J. Biotechnol.* 51(1): 83-88.
- Povolo S, Toffano P, Basaglia M & Casella S (2010) Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. *Biores. Technol.* 101(20): 7902-7907.
- Rai S K, Konwarh R & Mukherjee A K (2009) Purification, characterization and biotechnological application of an alkaline-keratinase produced by *Bacillus subtilis* RM-01 in solid-state fermentation using chicken-feather as substrate. *Biochem. Eng. J.* 45(3): 218-225.
- Reglamento de la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos (2009). Diario Oficial de la Federación, 18 de junio de 2009, 20 pp.
- Reglamento de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (RLGPGIR) (2006) Diario Oficial de la Federación, 30 de noviembre de 2006, 38 pp.
- Ribeiro H M, Romero A M, Pereira H, Borges P, Cabral F, & Vasconcelos E (2007) Evaluation of a compost obtained from forestry wastes and solid phase of pig slurry as a substrate for seedlings production. *Biores. Technol.* 98(17): 3294-3297.
- Rodríguez O V & Hansen H (2007) Obtención de dextrano y fructosa, utilizando residuos agroindustriales con la cepa *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F. *Revista de la Escuela de Ingeniería de Antioquia, Medellín (Colombia)* 7: 159-172.
- Rosales-Colunga L M, Razo-Flores E, Ordoñez L G, Alatríste-Mondragón F & De León-Rodríguez A (2010) Hydrogen production by *Escherichia coli* $\Delta hycA$ $\Delta lacI$ using cheese whey as substrate. *Int. J. Hydrogen Energy* 35: 491-499.
- Sánchez-Monedero M A, Cayuela M L, Mondini C, Serramiá N & Roig A (2008) Potential of olive mill wastes for soil C sequestration. *Waste Management* 28(4): 767-773.
- Sánchez-Monedero M A, Serramiá N, García-Ortíz C C, Fernández-Hernández A & Roig A (2010) Greenhouse gas emissions during composting of two-phase olive mill wastes with different agroindustrial by-products. *Chemosphere* 81(1): 18-25.
- Sandoval C J, Vergara M, Carreño M & Castillo E F (2009) Microbiological characterization and specific methanogenic activity of anaerobe sludges used in urban solid waste

- treatment. *Waste Management* 29(2): 704-711.
- Sans C, Mata-Alvarez J, Cecchi F, Pavan P & Bassetti A (1995) Volatile fatty acids production by mesophilic fermentation of mechanically-sorted urban organic wastes in a plug-flow reactor. *Biores. Technol.* 51(1): 89-96.
- Saucedo G (2010) La oportunidad de la Biotecnología y la Bioingeniería frente a los residuos de las grandes ciudades. *BioTecnología* 14(2): 4-5.
- Saval S, Solorzano R, Alpizar L, Cea A & Huitron C (1982) Production of pectinases by submerged fermentation of henequen pulp. *In Use of Enzymes in Food Technology*, Ed. P. Dupuy, Versailles, France, pp. 531-535.
- Saval S & Huitron C (1983) Microbial pectinases from henequen pulp. *Dev. Ind. Microbiol.* 24: 547-551.
- Saval S, Solórzano R, Alpizar L, Cea A & Huitrón C (1983) Producción de pectinasas a partir de pulpa de henequén. *En Biotecnología de Enzimas*, Ed. C. Huitrón, UNAM, CONACyT, OEA, México, pp. 203-215.
- Secretaría de Energía (2008) Programa de Introducción de Bioenergéticos, 39 pp.
- Secretaría de Energía (2009) Energías renovables para el desarrollo sustentable en México, con el apoyo de GTZ, 70 pp.
- Sobrinho H B S, Rufino R D, Luna J M, Salgueiro A A, Campos-Takaki G M, Leite L F C & Sarubbo L A (2008) Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. *Proc. Biochem.* 43(9): 912-917.
- Suvarna L G, Subba R C, Sreenivas R R, Hobbs P J & Shetty P R (2009) Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: A statistical optimization. *Biochem. Eng. J.* 48(1): 51-57.
- Takagi M, Abe S, Suzuki S, Emert G H, & Yata N (1977) A method for production of alcohol directly from cellulose using cellulose and yeast. *Proc. Bioconversion Symp., ITT Delhi* 551-571.
- Thanapimmentha A, Luadsongkram A, Titapiwatanakun B & Srinophakun P (2012) Value added waste of *Jatropha curcas* residue: Optimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology. *Ind. Crops Prods.* 37(1): 1-5.
- Tosun I, Gönüllü M T, Arslankaya E & Günay A (2008) Co-composting kinetics of rose processing waste with OFMSW. *Biores. Technol.* 99(14): 6143-6149.
- Valdez-Vazquez I, Acevedo-Benitez J A & Hernandez-Santiago C (2010) Distribution and potential of

Artículos

- bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renew. Sust. Energy Rev.* 14: 2147-2153.
- Viniegra G (2008) Los biocombustibles y la biotecnología de vanguardia. *BioTecnología* 12(1): 3-5.
- Yusuf N N A N, Kamarudin S K & Yaakub Z (2011). Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Conversion Management* 52: 2741-2751.
- Zervakis G, Yiatras P & Balis C (1996) Edible mushrooms from olive oil mill wastes. *Int. Biodet. Biodegr.* 38(3-4): 237-243.

Producción de Pectinasas por *Aspergillus flavipes* FP-500 en Cultivo Alimentado

Aurora Martínez-Trujillo¹, Juan S. Aranda², Guillermo Aguilar-Osorio^{3*}

¹Laboratorio de Catálisis enzimática. Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. Av. Tecnológico esq. Av. Carlos Hank González. Ecatepec, Estado de México, CP 55210

²Departamento de Bioingeniería. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotechnología, Instituto Politécnico Nacional. Av. Acueducto s/n, Col. La Laguna Ticomán, D.F. México, CP 07340

³Departamento de Alimentos y Biotechnología, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Conj. E, Química. D.F., México, CP 04510, Tel: 56 22 53 05, E-mail: gao@unam.mx

RESUMEN

La producción de pectinasas por *Aspergillus flavipes* FP-500 con diferentes fuentes de carbono y condiciones de pH del medio fue analizada utilizando el sistema de cultivo alimentado. Para el estudio del efecto de la fuente de carbono la alimentación se realizó alternando pectina y glucosa en la corriente de alimentación, por diferentes periodos de tiempo. En la corriente de alimentación se alternaron las fuentes de carbono en dos formas pectina-glucosa-pectina y glucosa-pectina-glucosa para identificar el efecto inductor/represor cuando se alimentan alternadamente y en concentraciones limitantes sobre la producción de las pectinasas producidas por este hongo. El efecto del pH fue analizado utilizando únicamente pectina en la corriente de alimentación. Los resultados obtenidos indicaron que la producción de exopectinasas es fundamentalmente constitutiva, pero se induce por la presencia de sustancias pécticas y puede sufrir un efecto represor de la glucosa que al parecer es transitorio. Las endopectinasas, cuya producción también es inducida por la pectina, presentan una fuerte represión por glucosa. *A. flavipes* FP-500 produce exopectinasas en un intervalo de pH entre 2.6 y 5.0, mientras que la producción de endopectinasas se restringe a valores de pH entre 3.5 y 5.0.

Palabras clave: pectinasas, cultivo alimentado, *Aspergillus flavipes* FP-500

ABSTRACT

The production of pectinases by *Aspergillus flavipes* FP-500 was analyzed using fed-batch cultures at different pH values and carbon source. To study the effect of carbon source the feeding was made by alternating pectin and glucose in the feeding stream, for different periods of time. The feeding was either pectin-glucose-pectin or glucose-pectin-glucose in order to identify the effect as inductors/repressors of pectin and glucose at limiting concentration on the different pectinolytic activities produced by this fungus. The effect of pH was analyzed using pectin as the only carbon source in the feeding stream. Our results showed that exo-pectinases were produced in constitutive fashion. However, the production of this activity was stimulated in the presence of pectic substances and repressed by the presence of glucose in a transient fashion. Meanwhile, endo-pectinases were clearly induced by pectin and it showed to be strongly repressed by glucose. Exo-pectinases produced by *A. flavipes* FP-500 were favored at pH values between 2.6 and 5.0 while endo-pectinases were only produced in a narrower range of 3.5-5.0.

Key words: Pectinases, fed-batch culture, *Aspergillus flavipes* FP-500

INTRODUCCIÓN

La pectina y las pectinasas

La pared celular de los materiales cítricos está conformada en su mayoría por tres polisacáridos: celulosa, hemicelulosa y pectina (de Vries & Visser, 2001). La pectina forma parte de la pared celular primaria, y su función es estabilizar a las microfibrillas de celulosa, así como a otros polímeros y proteínas (Annis & Goodwin, 1997). Es un heteropolisacárido de estructura compleja formada por una cadena lineal de unidades de ácido D-galacturónico unidas entre sí por enlaces α ,1-4, en la región del homogalacturonano, misma que en ocasiones puede estar intercaladas con unidades de L-ramnosa, lo que conforma la región del ramnogalacturonano. Esta región se caracteriza además por presentar ramificaciones de carbohidratos de diversos

tipos, como arabinosa, galactosa, xilosa, ácido ferúlico, apiosa y fucosa, entre otros (de Vries y Visser, 2001; Jayani *et al*, 2005). Las pectinasas son un grupo de enzimas de diversos tipos encargadas de degradar a la pectina hasta sus compuestos monoméricos elementales. Las actividades enzimáticas que actúan sobre la cadena principal de la pectina comprenden a las hidrolasas, que actúan sobre los enlaces α -1,4-glicosídicos. Dado su modo de acción estas pueden ser del tipo endo, si actúan de manera aleatoria a lo largo de la cadena principal, o exo, si actúan sobre los finales no reductores de los oligogalacturónidos (Kashyap *et al.*, 2001; Nitire, 2008).

Regulación de la actividad pectinolítica

Las pectinasas pueden tener distintas funciones, en dependencia del organismo

que las produce. Así, mientras que en los hongos saprófitos, como *A. niger*, estas enzimas son importantes para proveer al microorganismo los nutrientes a partir de los materiales de su medio ambiente, en el caso de los microorganismos fitopatógenos, como *A. flavus*, intervienen en la degradación de la pared celular durante el proceso de invasión microbiana a las células vegetales (Parenicová, 2000).

Considerando la complejidad y tamaño molecular de los polisacáridos que conforman a los materiales que suelen invadir los hongos filamentosos, es clara la dificultad para su asimilación cuando dichos materiales fungen como su único sustrato. A ese respecto se ha demostrado que los hongos saprófitos producen de manera constitutiva una serie de isoformas de poligalacturonasas, cuya acción primaria sobre la pectina provoca la liberación de oligosacáridos y algunos grupos reductores, que a su vez inducen la expresión de las enzimas necesarias para lograr la acción masiva necesaria sobre esta estructura (Wubben *et al.*, 2000). Adicionalmente, la expresión de los genes inducibles es susceptible de regulación por represión catabólica por carbono (de Vries & Visser, 2003).

Los procesos de regulación de la expresión de pectinasas no han sido plenamente elucidados, debido a la complejidad y diversidad de los sustratos que las inducen. Sin embargo, se ha observado

que la síntesis del complejo pectinolítico pareciera estar controlada, al nivel de transcripción, por al menos tres mecanismos diferentes: la inducción específica por pectina o ácido galactrónico, la represión catabólica mediada por el factor transcripcional CreA y la regulación por el pH ambiental, controlada por el factor transcripcional PacC (Bruno-Bárcena *et al.*, 2002).

Respecto a la inducción del sistema pectinolítico, se ha reportado en *A. niger* al ácido D-galacturónico y la pectina como los principales inductores de la expresión de la mayoría de los genes que codifican para enzimas pectinolíticas (de Vries, 2003), mientras que fuentes como la L-arabinosa, L-ramnosa o ácido ferúlico provocan la expresión de subseries de genes pectinolíticos. En lo que se refiere a la represión catabólica de las pectinasas, se ha observado que muchas de estas enzimas, dependiendo del sistema biológico que las produzca, pueden sufrir represión catabólica por carbono. Los principales represores de los sistemas pectinolíticos son las fuentes de carbono fácilmente metabolizables, como glucosa, fructosa y sacarosa. El principal elemento involucrado en el proceso de represión catabólica de las pectinasas es la proteína CreA (Parenicová, 2000; de Vries, 2003; Akimitsu *et al.*, 2004).

Por otro lado, el pH del medio de cultivo evoluciona a medida que sucede la producción de metabolitos por parte de los microorganismos que se están desarrollando

en el medio. De hecho, el pH del medio tiene un efecto importante sobre el crecimiento y la formación del producto, al influenciar tanto la ruptura de los sustratos como el transporte de estos y de los productos a través de la pared celular.

Los microorganismos producen enzimas activas en amplios intervalos de pH como estrategia de supervivencia (Prusky & Yakobi, 2003). Aún cuando se ha documentado la secreción de enzimas y metabolitos de diversos tipos en dependencia del pH del cultivo, todavía no se ha profundizado en el estudio de tales procesos regulatorios para la producción de pectinasas por microorganismos saprófitos. Existen reportes en los que se mencionan algunos genes de *A. nidulans* sujetos a regulación por el pH ambiental, con lo que se ha logrado saber que las poligalacturonasas se secretan a bajos pH, mientras que las pectato liasas lo hacen cuando el pH del medio se incrementa, lo que sugiere que los patógenos son capaces de modular el pH del huésped como un mecanismo para incrementar su potencial invasivo (Eshel *et al.*, 2002). En general, la regulación de la expresión de poligalacturonasas por el pH está mediada por la acción de la proteína PacC (de Vries & Visser, 2001).

Los sistemas de cultivo y su utilidad en el estudio fisiológico de la producción de enzimas

Cuando se desea estudiar tanto la fisiología como los aspectos cinéticos y metabólicos que conlleva la producción de pectinasas, se opta por el uso de metodologías desarrolladas en cultivos líquidos en donde los parámetros involucrados sean de fácil medición, con las que sea posible generar correlaciones (Teixeira *et al.*, 2000; Jacob & Prema, 2006; Oncu *et al.*, 2006; Favela-Torres *et al.*, 2006; Cavalitto & Mignone, 2007; Gummadi & Kumar, 2008). Dos de las técnicas más utilizadas para tal fin son el cultivo en lote y el cultivo en lote alimentado.

El cultivo en lote es uno de los métodos más simples empleados para el desarrollo de cultivos líquidos. Se caracteriza por el hecho de que la concentración de sustratos, productos y células, así como el estado fisiológico y metabólico celular, cambian con el tiempo del proceso. De igual manera, parámetros como el pH y el oxígeno disuelto cambian, a menos de que se establezcan estrategias adecuadas para su control (Ramírez Reivich, 2004).

Cuando la generación de productos y subproductos provoca efectos negativos sobre la formación de los metabolitos de interés, o bien el sistema de producción es susceptible a represión por la concentración del sustrato, una alternativa es el empleo del cultivo alimentado. En este, uno o varios de los nutrientes limitantes se suministran a lo largo del cultivo y la alimentación de los sustratos puede hacerse por pulsos, o de

manera continua; por lo que el volumen del cultivo se incrementa. A pesar del cambio en el volumen de operación, el valor de ciertas variables clave, como las concentraciones del sustrato y biomasa pueden controlarse en valores relativamente constantes. Mediante el desarrollo del cultivo alimentado se puede además controlar la velocidad de crecimiento dentro de los intervalos que favorezcan una función objetivo particular (Ramírez Reivich, 2004; Najafpour, 2007).

Con lo anterior, el presente trabajo tuvo por objetivo el uso del cultivo alimentado para estudiar el efecto de la fuente de carbono en concentraciones limitantes y el pH del medio sobre la producción de poligalacturonasas por *Aspergillus flavipes* FP-500.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo.

Se utilizó la cepa *Aspergillus flavipes* FP-500, que se mantuvo en refrigeración en cajas con agar papa-dextrosa mediante resiembras periódicas.

Composición del medio.

Para todos los experimentos, *A. flavipes* FP-500 se hizo crecer en medio basal, que contenía, en g/L: K_2HPO_4 , 2; KH_2PO_4 , 2; y $(NH_4)_2SO_4$, 5. El pH inicial del medio se ajustó con la ayuda de soluciones de NaOH o H_2SO_4 2 M, hasta lograr el valor deseado en cada caso. El medio se esterilizó a 121°C y 1.5 psia durante 20 min. A esta solución basal se adicionó, al momento de la

inoculación, la fuente de carbono en la concentración final adecuada para cada experimento.

Inóculo

La suspensión de esporas que sirvió como inóculo se obtuvo a partir de cultivos desarrollados en cajas petri con tres días de crecimiento, utilizando solución salina (NaCl al 0.9%). Cada experimento se inoculó con el volumen adecuado de esta suspensión para tener 1×10^6 esporas/mL.

Cultivo por lote en fermentador.

Para observar la evolución de los parámetros de operación a lo largo del cultivo y conocer la relación de este con la producción de las pectinasas, se utilizó un biorreactor BioFlo 110, Newbrunswick Scientific, de 7 L, con 5 L de volumen de operación. Durante el desarrollo de estos experimentos se utilizó el medio basal descrito previamente, y como única fuente de carbono se empleó glucosa o pectina al 1% (p/v). Todos los experimentos se inocularon con 1×10^6 esporas/mL. Los cultivos operaron a 400 rpm, 37°C y 0.5 vvm de aire, registrando la evolución del oxígeno disuelto (dO_2). Se retiraron muestras periódicas cada 4 h, a las cuales se les determinó la concentración de biomasa, el consumo de sustrato, la concentración de grupos reductores y las actividades pectinolíticas, mediante las técnicas descritas más adelante.

Artículos

Cultivo alimentado en fermentador

Para su diseño y análisis cinético, tanto el cultivo por lote como el cultivo alimentado parten de los mismos balances de materia. Así, las ecuaciones que definen los balances

$$\frac{d(V\rho)}{dt} = \rho F$$

$$\frac{dXV}{dt} = q_X V$$

$$\frac{dSV}{dt} = -q_S V$$

$$\frac{dPV}{dt} = q_P X V$$

Donde V es el volumen de reacción, ρ es la densidad del medio de cultivo y F representa al flujo de alimentación; mientras que las expresiones de velocidad (q_X , q_S y q_P) se definen como:

$$q_X = \mu X$$

$$q_S = -\frac{q_X}{Y_{XS}}$$

$$q_P = \frac{dP}{dt} = -Y_{PS} \frac{dS}{dt}$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento. Estas ecuaciones asumen que el sustrato sólo se usa para la formación de biomasa (x) y producto (p). Y_{XS} y Y_{PS} representan el rendimiento de conversión del sustrato en biomasa y producto, respectivamente, y se definen como:

$$Y_{XS} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{\text{Biomasa producida}}{\text{Sustrato consumido}}$$

$$Y_{PS} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{\text{Producto generado}}{\text{Sustrato consumido}}$$

Estas ecuaciones de balance describen el comportamiento macroscópico promedio del sistema de producción, y dependiendo del tipo de cultivo que se esté desarrollando,

para la masa total del sistema de reacción ($V\rho$), generación de biomasa (X), consumo de sustrato (S) y la formación de producto (P) se expresan mediante las ecuaciones diferenciales:

Balance total de masa

Para generación de biomasa

Para consumo de sustrato

Para generación de producto

las ecuaciones toman formas específicas para describir el comportamiento del mismo, tal como se muestra en la Tabla 1.

Artículos

Tabla 1. Balances de materia para el cultivo en lote y el cultivo alimentado a partir de los balances generales¹.

Parámetro para balance	Cultivo en lote	Cultivo alimentado ²
	Volumen constante, no hay flujo de entrada	Volumen variable, existe flujo de entrada
Volumen	$\frac{dV}{dt} = 0$	$\frac{dV}{dt} = F$
Flujo	$F = 0$	$F \neq 0$
Generación de Biomasa	$\frac{dX}{dt} = q_x = \mu X$	$\frac{dX}{dt} = \mu X - \left(\frac{F}{V}\right)X$
Consumo de sustrato	$\frac{dS}{dt} = -q_s X = -\frac{1}{Y_{XS}} \mu X$	$\frac{dS}{dt} = \left(\frac{F}{V}\right)S_0 - \frac{1}{Y_{XS}} \mu X$
Generación del producto	$\frac{dP}{dt} = q_p X$	$\frac{dP}{dt} = q_p X - \left(\frac{F}{V}\right)P$

1 Para el desarrollo de las ecuaciones específicas para cada cultivo, se expandieron los términos diferenciales, calculando los productos de las dos derivadas.

2 La relación entre el flujo y el volumen (F/V), se conoce como Factor de dilución (D).

Para establecer el cultivo alimentado, se utilizaron los parámetros cinéticos del microorganismo al desarrollarse en un cultivo en lote sobre la fuente de carbono deseada (glucosa o pectina), en un valor de pH constante, mismos que se indican en la Tabla 2. Los cultivos comenzaron en un volumen de 2 L bajo la operación de cultivo por lote, aunque se formularon con la concentración de sales adecuada para un volumen final de 5 L y la aireación se suplementó a 2.5 L/min a lo largo de todo el régimen de alimentación.

Con ello se logró que en todo momento tanto las sales que componían al medio basal como la oxigenación estuvieran en exceso. La alimentación comenzó cuando el sistema presentaba condiciones de baja concentración de sustrato (<1 g/L). La concentración de biomasa obtenida al alcanzar esa condición sirvió para calcular la concentración que debería tener el sustrato en el flujo de alimentación, mediante la siguiente expresión:

$$S_0 = \frac{X_{Lote}}{Y_{XS}}$$

Donde

S_0 es la concentración de sustrato en la corriente de alimentación.

Artículos

X_{Lote} es la concentración de biomasa en el tiempo en que se alcanzan las condiciones adecuadas para comenzar a alimentar.

Y_{xs} es el rendimiento biomasa-sustrato, parámetro calculado a partir de la modelación de los resultados obtenidos del cultivo en lote.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de cultivos en lote utilizados para calcular la concentración de sustrato en la alimentación

Sustrato utilizado en el cultivo base	Parámetros cinéticos ¹		Tiempo en el que $S_{lote} \leq 1$ (h)	X_{Lote} (g/L)	S_0 (g/L)
	μ (h ⁻¹)	Y_{xs} (g/g)			
Glucosa	0.0716	0.2259	90	1.4	6.17
Pectina	0.6218	0.5869	44	4.06	6.92

1 Los parámetros cinéticos se calcularon a partir del cultivo por lote desarrollado en la fuente de carbono correspondiente y se estimaron mediante el procedimiento reportado en Martínez-Trujillo et al (2008)

Para el proceso de alimentación se utilizó un flujo de 0.042 L/h, con el objetivo de incrementar 1 L/día el volumen del reactor. El régimen de alimentación se dividió en tres etapas de 24 h, mediante las cuales se intentó resolver si las condiciones específicas empleadas en cada caso provocaban un cambio en la producción de pectinasas. No obstante el régimen de alimentación, durante la primera etapa se utilizaron las mismas condiciones del cultivo lote que sirvió como proceso iniciador.

Para descartar el efecto de la evolución del pH sobre la producción de las pectinasas, el valor de este parámetro se mantuvo constante durante todo el experimento, mediante la adición de NaOH o H₂SO₄ 2 M. Durante la alimentación los cultivos se mantuvieron a 37°C y una agitación de 400

rpm, tomando muestras periódicas cada 4 h. Las muestras se filtraron, para cuantificar la concentración de biomasa, y la fracción filtrada se mantuvo en congelación hasta su análisis, en el cual se cuantificó la concentración de sustratos, carbohidratos reductores y las actividades pectinolíticas.

Los regímenes de alimentación utilizados en esta etapa experimental fueron de dos tipos. En el primero, se revisó el efecto de la fuente de carbono, mientras que con el segundo se analizó el resultado de la variación del pH sobre la producción de las pectinasas por *A. flavipes* FP-500. La Tabla 3 muestra la sucesión de sustratos utilizados durante las etapas de alimentación de los experimentos desarrollados en el primer bloque.

Artículos

Tabla 3. Sucesión de fuentes de carbono durante la etapa de alimentación en el cultivo alimentado.

Experimento	Fuente de carbono utilizada en el cultivo lote base	Fuente de carbono alimentada en la Etapa I	Fuente de carbono alimentada en la Etapa II	Fuente de carbono alimentada en la Etapa III
Pec-Glu-Pec	Pectina	Pectina	Glucosa	Pectina
Glu-Pec-Glu	Glucosa	Glucosa	Pectina	Glucosa

Técnicas de analíticas

Cuantificación de la concentración de biomasa.

El crecimiento celular obtenido en cada muestra se determinó mediante la técnica de peso seco, expresándose en g/L.

Cuantificación de la actividad de exopectinasas.

La actividad exopectinolítica se cuantificó mediante la determinación de los carbohidratos reductores producidos después de incubar una mezcla de pectina al 1% (p/v) pH 5 y regulador de acetatos 100 mM con la muestra, a 45 °C durante 20 min. Las lecturas obtenidas se compararon contra una curva patrón de ácido galacturónico (1 mg/mL). Una unidad de actividad exopectinolítica se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de ácido galacturónico bajo las condiciones de ensayo (Trejo-Aguilar *et al.*, 1996).

Cuantificación de la actividad de endopectinasas.

La actividad de endopectinasas se determinó con base en el cambio relativo que provocaban 0.5 mL de muestra sobre la viscosidad de 10 mL de una solución de pectina al 1% (p/v) pH 4.2, con la ayuda de un viscosímetro Canon Fenske # 200. Una unidad de actividad endo se definió como la cantidad de enzima capaz de reducir la viscosidad de la pectina en un 50% después de 10 min de reacción (Trejo-Aguilar *et al.*, 1996).

Cuantificación de la concentración de azúcares reductores.

El consumo de sustrato (en los experimentos con monosacáridos como fuentes de carbono) o la aparición de grupos reductores (en el caso de las fermentaciones con polisacáridos como fuentes de carbono) se determinaron mediante la cuantificación de carbohidratos reductores en las muestras, utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959). La cantidad adecuada de muestra se llevó a un volumen final de 1 mL, considerando que la concentración máxima de muestra que detecta esta técnica es de 1

mg/mL. A la muestra diluida adecuadamente, se le agregaron 2 mL del reactivo DNS y se sometieron a ebullición por 5 min. Posteriormente, a cada tubo se le agregaron 5 mL de H₂O y se leyeron en el espectrofotómetro a 575 nm, utilizando un blanco preparado con agua en vez de muestra. La concentración obtenida en cada caso se calculó utilizando las curvas patrón de los azúcares correspondientes.

Cuantificación de la concentración de pectina en los cultivos.

El consumo de sustrato en los experimentos en los que se utilizaron polisacáridos como fuente de carbono se estimó mediante la técnica descrita por Dubois *et al.* (1956). Para ello, la cantidad necesaria de muestra se llevó a un volumen final de 2 mL, considerando que la concentración máxima de muestra que detecta esta técnica es de 0.1 mg/mL. A la muestra diluida adecuadamente, se le agregó 1 mL de fenol al 5% (p/v) y 5 mL de H₂SO₄ concentrado. Después de dejar reposar los tubos durante 20 min, estos se leyeron en el espectrofotómetro a 480 nm, utilizando un blanco preparado con agua en vez de muestra. Las lecturas se compararon contra curvas patrón de pectina o ácido poligalacturónico, para determinar la concentración del polisacárido correspondiente en cada tiempo de operación del cultivo.

RESULTADOS

Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de pectinasas

Para el desarrollo de esta etapa experimental, se realizaron dos cultivos. Para ambos, se estableció un cultivo por lote con la fuente de carbono que serviría como base de análisis, en una concentración de 10 g/L. Cuando se alcanzó una concentración menor de 1 g/L de esa fuente de carbono, misma que se indica en la Tabla 2, comenzó la secuencia de alimentación correspondiente, de acuerdo al orden de alimentación señalado en la Tabla 3. Cada etapa de alimentación duró 24 h, durante las cuales se retiraron muestras cada 4 h para su posterior análisis. Después de que se concluyó la alimentación (lo que se indica con la flecha en las figuras correspondientes), se permitió que el cultivo continuara desarrollándose durante 6 h más, y se tomaron dos muestras ante esas condiciones, antes de dar por concluido el experimento.

Los cultivos se desarrollaron en condiciones fisiológicas aproximadamente constantes a lo largo del régimen de alimentación, como se puede apreciar en la figura 1.

En el experimento Pec-Glu-Pec (ver tabla 3), la concentración de biomasa a lo largo del proceso de alimentación se mantuvo prácticamente constante en las etapas I y II, en un valor entre 1.5 y 2 g/L, y se incrementó en la Etapa III, donde se alcanzaron valores de casi 3 g/L. Sin embargo, al final de esta

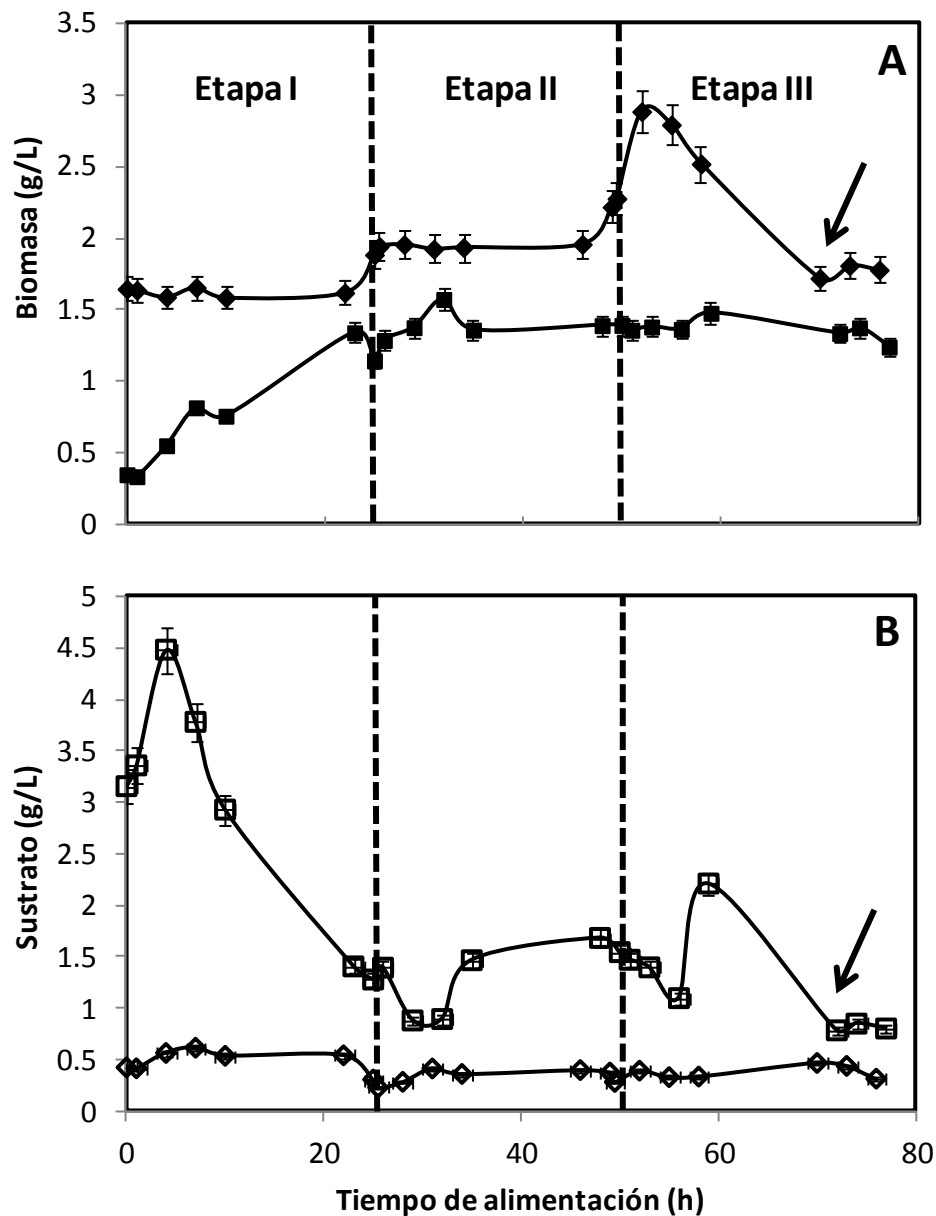


Fig. 1. Evolución de la concentración de Biomasa (A) y Sustrato (B) durante las etapas de alimentación del cultivo alimentado en los experimentos Pec-Glu-Pec (◆ y ◇) y Glu-Pec-Glu (■ y □). Las flechas indican el final de la fase de alimentación.

etapa la concentración de biomasa volvió a decrecer, llegando a los valores encontrados en un inicio (figura 1A). En lo que respecta a la concentración de pectina, ésta se mantuvo

constante a lo largo del régimen de alimentación (figura 1B).

En el experimento Glu-pec-Gluc la biomasa se incrementó de 0.3 a 1.3 g/L

Artículos

durante la Etapa I y luego permaneció constante hasta el final de la operación del cultivo (figura 1A), lo que fue congruente con el consumo de sustrato, que sucedió principalmente en la Etapa I, luego de la cual la concentración alcanzada se mantuvo constante, no obstante el proceso de alimentación (figura 1B). Para bloquear el

efecto del incremento de biomasa en alguna de las etapas de alimentación, así como el de la dilución generada por la alimentación, se reportan las actividades enzimáticas por gramo de biomasa. En lo que respecta a la producción de exopectinasas, en el experimento Pec-Glu-Pec (Figura 2A), esta actividad pectinolítica se mantuvo prácticamente

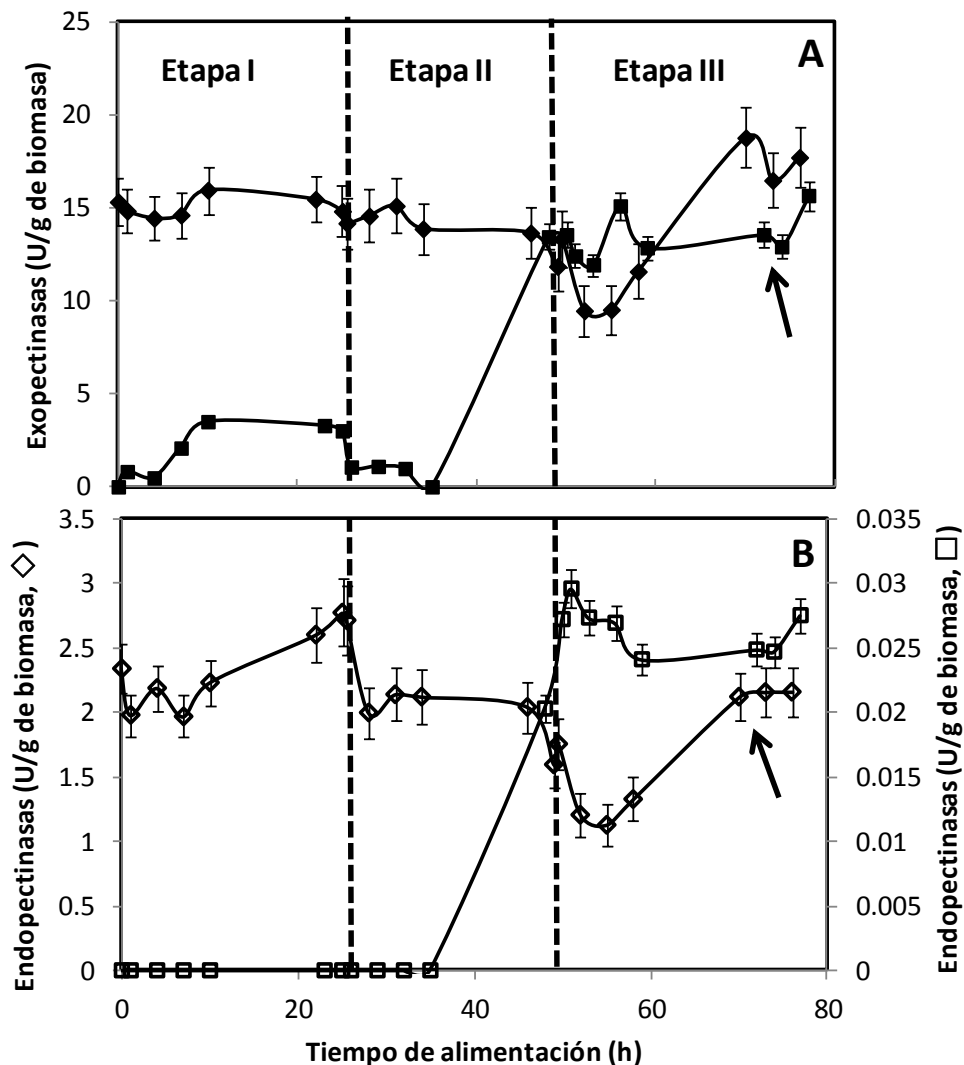


Fig. 2. Evolución de la producción de exopectinasas (A) y endopectinasas durante las etapas de alimentación del cultivo alimentado en los experimentos Pec-Glu-Pec (◆ y ◇) y Glu-Pec-Glu (■ y □). Las flechas indican el final de la fase de alimentación.

constante a lo largo de las Etapas I y II, alrededor del valor obtenido con el cultivo en lote ($\square$ 15 U/g de biomasa. Sin embargo, hacia el final de la Etapa II esta actividad disminuyó casi a la mitad, aunque luego recuperó hasta ser incluso ligeramente mayor que la observada en un principio.

Durante el experimento Glu-Pec-Glu, la producción de exopectinasas fue muy baja ($\sim$ 3 U/g de biomasa) durante la Etapa I y la mitad de la Etapa II, aunque luego se incrementó cuatro veces, hasta alcanzar $\sim$ 20 U/g de biomasa, en la que se mantuvo hasta el final de la operación del régimen de alimentación.

En lo que se refiere a la producción de endopectinasas, en el experimento Pec-Glu-Pec, esta se mantuvo prácticamente constante alrededor de 3 U/g e biomasa durante todo el proceso de alimentación (figura 2B). En el experimento Glu-Pec-Glu, la producción de endopectinasas no se observó durante el cultivo por lote desarrollado sobre glucosa, ni durante la Etapa I, donde la glucosa fue la fuente de carbono utilizada en la alimentación. Con la pectina, esta actividad se incrementó hasta $\sim$ 0.03 U/g de biomasa, pero la alimentación de glucosa en la Etapa III disminuir 17%, para luego mantenerse constante hasta el final del régimen de alimentación (figura 2B).

La relación del pH con la producción de pectinasas por A. flavipes FP-500

Para complementar los resultados obtenidos, se verificó el efecto de pH del medio sobre la producción de las pectinasas en condiciones fisiológicas cuasiestables. Para lo anterior, se llevó a cabo un cultivo alimentado, cuya base se desarrolló sobre pectina. En este caso, las diferentes etapas del régimen de alimentación se establecieron con base en el pH del cultivo. Así, la alimentación se realizó siempre con pectina pero durante la Etapa I el pH se mantuvo constante en 3.5, luego este se incrementó a 5.0 durante la Etapa II, y por último se bajó hasta 2.6 durante la última etapa de alimentación.

Como se puede observar, la concentración de biomasa permaneció relativamente constante durante las primeras dos etapas, mientras que en la última fase dicha concentración disminuyó notablemente (figura 3A). Como en el caso anterior, las actividades enzimáticas se reportan específicamente por g de biomasa. Durante Etapa I la producción de exopectinasas se incrementó ligeramente (Gráfica 3B), mientras que la de endopectinasas lo hizo casi 1 U/g de biomasa (figura 3C). En la Etapa II, la actividad exopectinolítica se incrementó $\sim$ 7 U/g de biomasa (figura 3B), mientras que la producción de endopectinasas permaneció aproximadamente constante (figura 3C). Durante la Etapa III, correspondiente al valor más bajo de pH en el medio, la actividad de exopectinasas disminuyó hasta los valores obtenidos

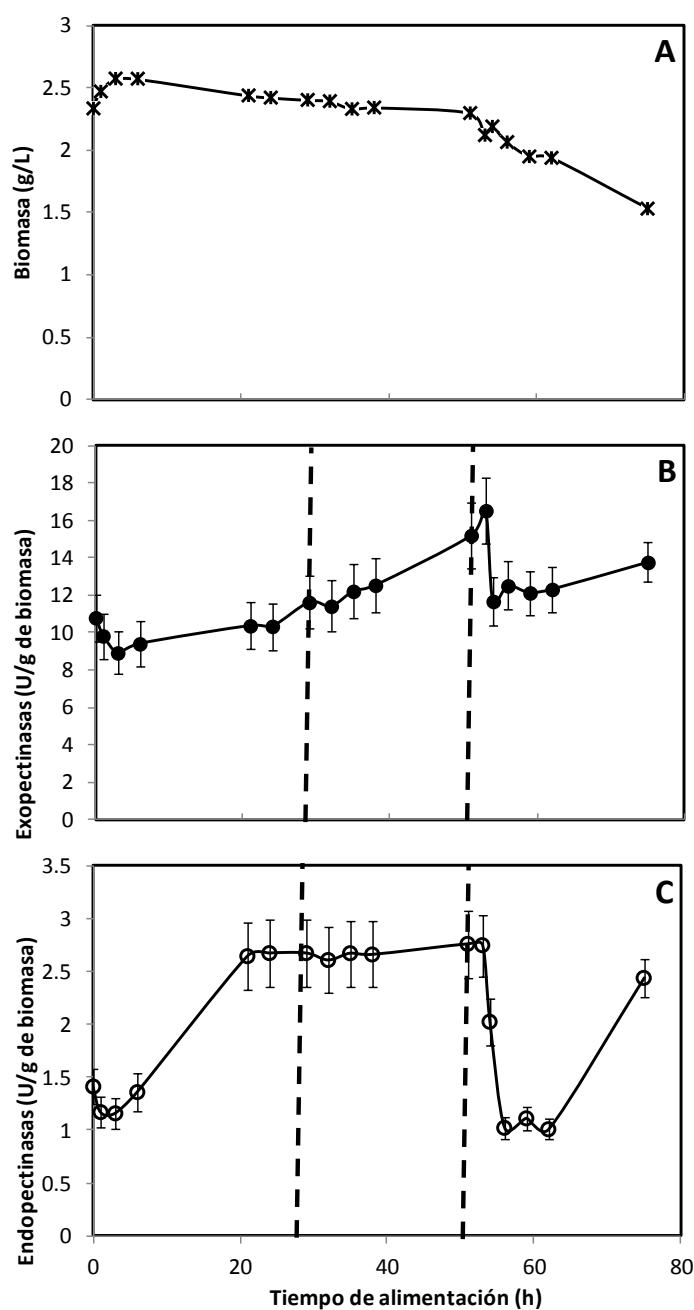


Fig. 3. Evolución de la Biomasa (A), producción de exopectinasas (B) y endopectinasas (C) producidas por *A. flavipes* FP-500 en un cultivo en lote alimentado desarrollado sobre pectina. En el régimen de alimentación se utilizó pectina en una concentración de 6.92 g L^{-1} y un flujo constante de 0.042 L h^{-1} . Durante la etapa I, se mantuvo el pH del medio constante en un valor de 3.5, en la etapa II el pH del medio fue de 5.0, y en la etapa III se provocó una disminución en el pH hasta 2.0. Se tomaron muestras periódicas cada 4 h durante el régimen de alimentación.

durante la Etapa I, y se mantuvo relativamente constante hacia el final de la alimentación (figura 3B), pero la actividad de endopectinasas sufrió primero una disminución severa durante las primeras horas de la Etapa III, aunque después se incrementaron hasta llegar al valor obtenido durante la Etapa II (figura 3C).

DISCUSIÓN

Los resultados observados en el estudio del efecto de las fuentes de carbono sobre la producción de pectinasas durante todas las etapas de alimentación sugieren que existe un momento, al inicio de las Etapas II y III, en el que hay una mezcla de las dos fuentes de carbono que han sido alimentadas al reactor. Además es muy probable que durante esa etapa de transición ambas fuentes de carbono sean utilizables por el microorganismo. A pesar de que ante las condiciones probadas no fue posible conocer la velocidad de consumo que presentó el microorganismo para cada una de ellas, es altamente probable que la fuente de carbono que se alimentó primero siga consumiéndose o bien comience a diluirse por efecto de la alimentación de la segunda. En cualquier caso, llegará un momento en el que la concentración de la fuente de carbono que se está alimentando en la etapa analizada será considerablemente mayor, y ejercerá el mayor efecto sobre el microorganismo. Al

parecer, este fenómeno sucede alrededor de las 14 h después del cambio en el sustrato de alimentación. El efecto de la mezcla de dos sustratos durante la operación de un cultivo alimentado se ha observado en diferentes procesos, por lo que se ha convertido en un parámetro de consideración para estudios de control de los procesos desarrollados mediante esta modalidad de cultivo (Picco-Marco & Navarro, 2008).

A partir del razonamiento anterior, y con base en el comportamiento observado se puede apreciar que la glucosa favoreció la formación de biomasa durante la alimentación (figura 1A), mientras que la alimentación de pectina permitió el mantenimiento de las condiciones fisiológicas pseudoestables. El efecto positivo de la glucosa en cultivos alimentados sobre el crecimiento es congruente con lo reportado para *Aspergillus niger* durante la producción de ácido cítrico (Papagianni *et al.*, 1999).

En lo que respecta a la producción de las poligalacturonasas, esta disminuyó cuando se utilizó glucosa en la corriente de alimentación (figuras 2A y 3A), lo que sugiere el efecto represor de esta fuente de carbono. Por otro lado, el evidente incremento que se obtuvo al sustituir la glucosa por pectina como la fuente de carbono predominante dentro del cultivo, indica el efecto inductor de la pectina sobre las mismas. Ambas observaciones son congruentes con lo

reportado para las pectinasas producidas por hongos del género *Aspergillus* (de Vries & Visser, 2001).

En lo que respecta a las actividades pectinolíticas del tipo exo producidas durante las fases de alimentación en las que la glucosa era la fuente de carbono principal, estas podrían corresponder a las isoformas constitutivas que se han sugerido para las exopectinasas de *A. flavipes* FP-500 (Martínez-Trujillo *et al.*, 2009), en concordancia con las reportadas para *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 (Aguilar & Huitrón, 1990), *A. niger* (Solís-Pereira *et al.*, 1993; Patil & Dayanand, 2006) y *A. japonicus* 586 (Teixeira *et al.*, 2001), entre otros. Además se debe destacar que, al sustituir la glucosa por la pectina en el reactor, la producción pectinolítica que había disminuido por acción de la primera volvió a incrementarse. Esto sugiere que la represión causada por la glucosa sobre la producción de exopectinasas podría ser transitoria o bien que existen isoformas de estas enzimas que son inducidas por pectina y que no se encuentran bajo el control del regulador CreA, por lo que no se ven afectadas por la presencia de glucosa. Por otra parte, el que no se observe una disminución en la actividad exopectinolítica debido a la adición de glucosa en la Etapa III podría deberse a que en este caso la concentración de glucosa es baja, y no aporta al efecto represor de esta fuente de carbono. Esto es congruente con lo observado para las poligalacturonasas

de *A. terreus*, que no parecieron estar sujetas a represión cuando había concentraciones bajas de glucosa en el medio (Runco *et al.*, 2000).

En lo que se refiere a la producción de la actividad endopectinolítica, esta no se observó en el cultivo en lote desarrollado en glucosa, además de verse muy afectada en los casos donde se sustituyó a la pectina por la glucosa como la fuente de carbono predominante. Esto muestra claramente el efecto represor que tiene la glucosa sobre esta actividad enzimática, mismo que ya había sido reportado anteriormente para otras cepas del género *Aspergillus* (de Vries & Visser, 2001).

Por otro lado, en lo que se refiere al efecto del pH sobre la producción de las pectinasas, en primera instancia se puede observar que la concentración de biomasa permaneció relativamente constante durante las primeras dos etapas de alimentación, mientras que en la última fase dicha concentración disminuyó notablemente (figura 3A). Lo anterior podría deberse al pH tan ácido en el que transcurrió esta última etapa, como sucedió con *Aspergillus oryzae* (Malvessi & Moura, 2004). Por otro lado, como en estos experimentos no hubo cambio en la fuente de carbono utilizada en la alimentación, el efecto del cambio de pH se observó de manera más inmediata.

En lo que se refiere a la producción de exopectinasas, a pesar de que el pH del medio se mantuvo constante, durante la

Etapa I de alimentación la producción de estas enzimas se incrementó 2.16 veces. Al parecer, esto mostró el efecto inductor de la pectina sobre la producción de esta actividad pectinolítica, como ya se había reportado antes para *Aspergillus* sp. en un cultivo alimentado (Aguilar & Huitrón, 1986). En la Etapa II, la actividad exopectinolítica se incrementó (figura 3B), lo que sugiere que existe un efecto positivo de los valores de pH cercanos a la neutralidad sobre la expresión de las exopectinasas.

Por otra parte, la producción de endopectinasas igualmente se incrementó durante Etapa I, aunque permaneció aproximadamente constante durante la segunda etapa de alimentación (figura 3C). Al parecer, en el pH de 3.5 se favoreció la producción de esta actividad pectinolítica, pero no así a pH de 5.0. Esto se concluyó luego de analizar que la estabilidad de las endopectinasas producidas en la Etapa I no se modificó en un pH de 5.0 (datos no mostrados). Finalmente, dado que la actividad endopectinolítica de *Aspergillus flavipes* FP-500 es muy estable en valores de pH ácidos (resultados no publicados), la disminución observada al inicio de la Etapa III podría deberse al decremento en la concentración de biomasa sucedido en esa etapa, mientras que el incremento observado en la segunda parte de la Etapa III sugiere que en esta fase se indujo la formación de endopectinasas ácidas.

Mediante el empleo del cultivo alimentado fue posible identificar el efecto de la fuente de carbono y el pH sobre la producción de pectinasas de *A. flavipes* FP-500. Los resultados obtenidos sugirieron que estas enzimas parecen presentar represión catabólica por glucosa, que es severa sobre las endopectinasas pero transitoria para las exopectinasas. La pectina tiene un fuerte efecto inductor sobre ambas actividades pectinolíticas. Además, las pectinasas del tipo endo se ven afectadas tanto por la concentración y tipo de la fuente de carbono como por el pH del medio de cultivo. Al parecer, *A. flavipes* FP-500 produce varias isoformas de exopectinasas, que se expresan ante diferentes valores de pH.

REFERENCIAS

- Aguilar G & Huitrón C (1986) Application of fed-batch cultures in the production of extracellular pectinases by *Aspergillus* sp. *Enzyme Microb. Technol.* 9: 541-545.
- Aguilar G & Huitrón C (1990) Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon source. *Biotechnol. Lett.* 12(9): 655-660.
- Akimitsu K, Isshiki A, Ohtani K, Yamamoto H, Eshel D & Prusky D (2004) Sugars and pH: A clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65: 271-275.
- Annis S L & Goodwin P H (1997) Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes

Artículos

- produced by plant pathogenic fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 103(1): 1-14.
- Bruno-Bárcena JM, Lucca ME, Siñeriz F & Ramón D (2002) pH regulation of enzyme production in *Aspergillus nidulans* growing in aerobic batch fermenter. *Biotechnol. Lett.* 24: 567-572.
- Cavalitto S F & Mignone CF (2007) Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Proc. Biochem.* 42: 175-179.
- de Vries, RP (2003) Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes, relevance for industrial production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 10-20.
- de Vries, R P & Visser, J (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65(4): 497-552.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA & Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28(3): 350-356.
- Eshel D, Miyara I, Ailing T, Dinoor A & Prusky D (2002) pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in Persimmon fruit. *MPMI.* 15(8): 774-779.
- Favela-Torres E, Volke-Sepúlveda T & Viniegra-González G (2006) Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2): 221-227.
- Gummadi SN & Kumar S (2008) Batch and fed batch production of pectin lyase and pectate lyase by novel strain *Debaryomyces nepalensis* in bioreactor. *Biores. Technol.* 99: 874-881.
- Jacob N & Prema P (2006) Influence of mode of fermentation on production of polygalacturonase by a novel strain of *Streptomyces lydicus*. *Food Technol. Biotechnol.* 44(2): 263-267.
- Jayani, R S, Saxena, S Y Gupta, R (2005) Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Proc. Biochem.* 40: 2931-2944.
- Kashyap, D R, Vohra, P K, Chopra, S Y Tewari, R (2001). Applications of pectinases in the comercial sector: a review. *Biores. Technol.* 77: 215-227.
- Malvessi E & Moura da Silveira M (2004) Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47(5): 693-702.
- Martínez-Trujillo A, Aranda JS, Gómez-Sánchez C, Trejo-Aguilar B & Aguilar- Osorio G (2009) Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from *Aspergillus flavipes* FP-500 and their modulation by pH and carbon source. *Braz. J. Microbiol.* 40: 40-47.
- Martínez-Trujillo A, Aranda JS & Aguilar- Osorio G (2008) Kinetic study on inducibility of polygalacturonases from *Aspergillus flavipes* FP-500. *Electronic J. Biotechnol.* 11(4): 1-8.

Artículos

- Miller G L (1959) Use of dinitrosalicylic acid (DNS) for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Najafpour G D (2007) Biochemical Engineering and Biotechnology. Primera Edición. Editorial Elsevier, Holanda.
- Niture, S K (2008) Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. *Biologia*, 63(1): 1-19.
- Oncu S, Unluturk S, Tari C & Gogus N (2006) Various factors affecting the pellet morphology, broth reology and pectinase enzyme production in submerged fermentation of *Aspergillus sojae*. IUFoST.DOI: 10.1051/IUFoST:20060271.
- Papagianni M, Matteya M & Kristiansena B (1999). The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture. *Enzyme Microb. Technol.* 25(8-9): 710-717.
- Parenicová, L (2000). Pectinases of *Aspergillus niger*: A Molecular And Biochemical Characterisation. Tesis de doctorado. Wageningen University. Holanda. ISBN 90-5808-203-2.
- Patil SR & Dayanand A (2006) Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. *Biores. Technol.* 97: 2054–2058.
- Pico-Marco E & Navarro JL (2008) A closed-loop exponential feeding law for multi-substrate fermentation processes. Proceedings of the 17th World Congress The International Federation of Automatic Control Seoul, Korea, July 6-11.
- Prusky D & Yakoby N (2003) Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? *Mol. Plant Pathol.* 4(6): 509–516.
- Ramirez-Reivich OT (2004) Ingeniería Bioquímica en “Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna”, Francisco G. Bolívar Zapata, Compilador y editor. Primera edición. Editorial de El Colegio Nacional, México, D.F.
- Runco R, Navarro AR & Maldonado MC (2001) Regulation of the production of polygalacturonase by *Aspergillus terreus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 487-491.
- Solís-Pereira S, Favela-Torres E, Viniegra-González G & Gutiérrez-Rojas M (1993) Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 36-41.
- Teixeira MFS, Lima Filho JL & Durán N (2001) Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Brazilian J. Microbiol.* 31: 286-290.
- Trejo-Aguilar B, Visser J & Aguilar-Orsorio G (1996). Pectinase secretion by *Aspergillus* FP-180 and *Aspergillus niger* N402 growing under stress induced by the pH of culture medium. *Proc. Pectin and Pectinases Symposium*, p. 915-920.

Artículos

Wubben JP, Have AT, van Kan JAL & Visser, J (2000). Regulation of endopolygalacturonase gene expression

in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. *Curr. Gen.* 37: 152-157.

Variación del Complejo Pectinolítico del Sistema Inmovilizado de *Aspergillus* HL por Efecto del pH y Temperatura

Nohemí Reyes¹, Ignacio Islas², Rosa Domínguez³, Gerardo Rivera³ y Sara Solís^{3*}

¹CIATEJ Unidad Sureste. C.30, N.151. García Ginerés, C.P. 97070,

²Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. C.43, N.130. Chuburná. C.P. 97200.

³Instituto Tecnológico de Mérida. Mérida, Yuc. México. C.P. 97118

TelFax: +52 999 9448479 .

E-mail: ssolis@itmerida.mx

RESUMEN

El pH y la temperatura modificaron los perfiles de producción de pectinasas por *Aspergillus* HL inmovilizado en gel de alginato de calcio. Se detectó alta estimulación de la actividad endopectinasa (endoP) cuando las condiciones de cultivo se ajustaron a 39°C y pH inicial 2.8 y la síntesis de pectina liasa (PL) se estimuló a pH 3.5 y 39°C. La actividad pectina esterasa (PE) pudo ser incrementada a menor temperatura 31°C y pH 3.5. Los zimogramas en geles de poliacrilamida mostraron bandas de actividad endoP y PL con masa molecular aparente de 45 kDa y 60 kDa respectivamente. Los resultados mostraron diferente respuesta en la actividad producida por el sistema libre y el inmovilizado y la viabilidad de las esferas de gel se comprobó por su reúso durante 23 días. Las células fúngicas atrapadas incrementaron la productividad pectinolítica hasta 17 veces con respecto a las células libres demostrando su potencial para futuras aplicaciones comerciales.

Palabras clave: Pectinasas, células inmovilizadas, pH y temperatura

ABSTRACT

Temperature and pH greatly influenced the composition of pectinases produced by *Aspergillus* HL immobilized in beads of Ca-alginate. A higher endopectinase (endoP) activity in cell free was detected when cultivation conditions were adjusted to 39 °C and pH 2.8. However, the synthesis of pectin lyase (PL) was stimulated when pH was changed to 3.5 and 39 °C. Pectin esterase activity (PE) could be improved at a lower temperature 31°C and pH 3.5. Zymograms on polyacrylamide gels showed endoP and PL bands with apparent molecular mass of 45 kDa and 60 kDa respectively. The long-term viability of the fungal cells was tested by reusing the immobilized system 23 days. The entrapped fungal cells increased endoP, PL

and PE productivities up to 17 times with respect to free cells demonstrating the potential of this system for commercial applications.

Keywords: *Pectinases, immobilized cells, pH and temperature*

INTRODUCCION

Las pectinasas son biocatalizadores ampliamente usados en la industria alimentaria. Estas enzimas facilitan el procesamiento de frutas y vegetales, de bebidas alcohólicas y la extracción de aceites, saborizantes y pigmentos a partir de plantas (Kashyap *et al.*, 2001). Se han descrito nuevas aplicaciones de las pectinasas como la obtención de oligogalacturónidos a partir de la pectina que son utilizados en la producción de alimentos funcionales (Manderson *et al.*, 2005) y en la industria farmacéutica como fuertes estimuladores del sistema inmune (Bedouet *et al.*, 2005). Dependiendo de su especificidad y el tipo de reacción que catalizan, las pectinasas se clasifican en pectina esterasas, poligalacturonasas y pectina liasas. Las pectina esterasas (EC 3.1.1.11) catalizan la desesterificación de la pectina en ácido péctico y metanol. Las poligalacturonasas (EC 3.2.1.15) y las pectina liasas (EC 4.2.2.10) catalizan el rompimiento del enlace glicosídico por hidrólisis y transeliminación respectivamente, generando mono y oligómeros de pectina como producto (Jayani *et al.*, 2005).

Las industrias procesadoras de alimentos requieren diferentes preparaciones enzimáticas para llevar a cabo la degradación completa o limitada de la pectina dependiendo del proceso (Jacob

& Prema, 2006). Por ejemplo, preparaciones con alta actividad PE y endoP son necesarias en los procesos de clarificación de jugos de frutas y vinos para reducir la viscosidad y mejorar la eficiencia de la filtración. Por otro lado, se requieren extractos ricos en PL y PE para la extrusión de la fruta (Phutela *et al.*, 2005). Las preparaciones pectinolíticas provenientes de hongos del género *Aspergillus* son ampliamente utilizadas en la práctica (Botella *et al.*, 2007) y los niveles de producción varían dependiendo del sustrato, el tipo de cultivo, la presencia de inhibidores o activadores y las condiciones físicoquímicas (Favela-Torres *et al.*, 2006). Por ejemplo, el ambiente de pH y la temperatura son parámetros clave que tienen gran influencia en las funciones fisiológicas como el crecimiento del hongo y la expresión de enzimas. Mediante la modificación del pH solo o interactuando con otras variables se han logrado modificar los perfiles pectinolíticos en cultivos de *Aspergillus niger*, lo que podría ser útil en la obtención de preparaciones con diferentes propósitos industriales (Taragano & Pilosof, 1999). Se ha detectado en cultivos de *Penicillium griseoroseum* que a pH 4.5 se estimula la actividad PG y PE y a pH 5-7 la actividad PL (Piccoli-Valle *et al.*, 2001).

Durante la agitación de los cultivos, las células fungales son sensibles a daño

mecánico, el cual es un factor que decrece la producción de enzimas, incrementa los costos de producción y dificulta la recuperación de las enzimas. En este sentido, la inmovilización de células de hongos pectinolíticos representa una estrategia cuyos beneficios industriales incluyen el incremento en la producción de enzimas, la integridad de las células y la posibilidad de reciclar la biomasa celular para producir nuevos ciclos de fermentación (Sadhana *et al.*, 2006). Sin embargo, este sistema ha sido poco explorado en hongos.

En este estudio se usó el hongo *Aspergillus* HL que previamente se inmovilizó en alginato de calcio. Debido al amplio potencial de estas enzimas es necesario estudiar varios aspectos relacionados con la producción de pectinasas en este sistema para obtener altos títulos de enzimas. El propósito de este trabajo está centrado en evaluar la influencia del pH y la temperatura en la producción de pectinasas y el reuso del sistema inmovilizado.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo

Se utilizó el híbrido pectinolítico *Aspergillus* HL de la colección de cultivos del Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (Solís *et al.*, 2009).

Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer con 200 ml del siguiente medio:

pectina 2%, K_2HPO_4 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2%. El pH se ajustó en un rango de 2.5-5.0 y la temperatura entre 27°C y 39°C. Los medios se inocularon con una suspensión de 4×10^6 esporas/ml. Para la inmovilización se adicionó 1 ml de inóculo a 5 ml de alginato de sodio (2%) en las condiciones descritas previamente (Reyes *et al.*, 2006). Los matraces se mantuvieron en agitación a 200 rpm y las esferas se recuperaron por filtración a las 72 h de cultivo.

Cultivo semicontinuo

La estabilidad operacional y reuso del hongo inmovilizado se determinó en cultivos batch consecutivos de 72 h a pH 3 y 39°C. Después de cada cultivo, las esferas se obtuvieron por filtración, se lavaron con una solución de $CaCl_2$ 0.05 M y se transfirieron a un medio fresco.

Biomasa

La biomasa atrapada se recuperó por filtración después de incubar las esferas en buffer citratos 0.2 M (pH 5) a 30°C y 200 rpm por 48 h, se secó a 60°C y se determinó el peso seco. La biomasa liberada se obtuvo mediante la filtración del cado de cutlivo y se midió el peso seco. El porcentaje de biomasa liberada se calculó con respecto a la biomasa total.

Determinación de la actividad endoP

La actividad se midió por el método reportado por Larios *et al.* (1998). La mezcla de reacción fue la siguiente: 500 µl de muestra en 10 ml de pectina 1% en

buffer acetatos (pH 4.2). La reducción de la viscosidad se monitoreó a 30°C en un viscosímetro Ostwald. Una unidad de actividad endoP (U) se definió como la cantidad de enzima que reduce 50% la viscosidad de la solución de pectina por minuto en las condiciones de ensayo.

Determinación de la actividad PL

Se empleó el método reportado por Delgado *et al.* (1992), el cual se basa en el incremento de la absorbancia a 230 nm ocasionado por la formación de productos insaturados de la pectina. La mezcla de reacción consistió en 0.5 ml del extracto enzimático, 1 ml de pectina cítrica (1%) y 1 ml de buffer Tris-HCl 0.05 M (pH 8.8). Las muestras se incubaron 2 h a 45°C y después se transfirió 1 ml a 4 ml de HCl 0.01 M frío. Una unidad (U) se definió como la cantidad de enzima que produce el incremento de 0.1 en absorbancia en las condiciones de ensayo.

Determinación de la actividad PE

Se midió por la disminución del pH a través de la titulación de los grupos carboxílicos liberados de la pectina de acuerdo a Kertesz (1937). Se usó una solución de pectina 1% en NaCl 0.1 M y un ml de extracto crudo enzimático, manteniendo el pH a 7.5 con una solución de NaOH 0.004 M durante 30 min a 30°C. Una unidad de actividad (U) es la cantidad de enzima que libera un microequivalente de grupos carboxílicos/ml/min en las condiciones de ensayo.

El rendimiento de las enzimas se expresó como productividad específica (U/mg de biomasa/h) y productividad volumétrica (U/l/h).

Electroforesis de proteínas y zimogramas

Se usaron geles de acrilamida 10%, bisacrilamida 2.7% y pectina 0.1%. Se adicionó 20 µg de proteína desnaturalizada y se corrieron los geles de acuerdo Aguilar *et al.* (1991). Se usaron los siguientes marcadores moleculares (kDa): albúmina sérica bovina 66, ovoalbúmina 45, y anhidrasa carbónica 29. Las proteínas presentes en el gel se renaturalizaron en buffer Tris-HCl 0.01 M (pH 7.6). Para identificar la actividad endoP y PE, los geles se incubaron en buffer acetatos 0.17 M (pH 5) a temperatura ambiente y después se tiñó el gel con una solución rojo de rutenio 0.05%. Para identificar la actividad PL, se incubó otro gel en una solución de CaCl₂ 0.01 M a 4°C y posteriormente se transfirió a buffer Tris-HCl (pH 8.8) con CaCl₂ 0.01M. Las bandas de actividad se detectaron por tinción con una solución de rojo de rutenio 0.03% (Mwenje & Ride, 1996).

Análisis estadístico

Todos los datos representan el valor promedio de dos experimentos por duplicado, a partir de los cuales se determinó la desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del pH y la temperatura

Artículos

Durante el cultivo del hongo inmovilizado se determinó que la temperatura modificó la producción de las pectinasas en un rango de temperatura de 27 a 39°C. En los extractos crudos obtenidos a las 72 h de cultivo se detectó la máxima producción endoP y PL a 39°C, mientras que a 31°C se incrementó la

actividad PE (Fig. 1). La variación en la productividad de las enzimas no se relacionó con el crecimiento, ni con el cambio de pH durante el cultivo, lo que sugiere que a alta temperatura tiene un efecto inductor de la síntesis y/o secreción particularmente de las enzimas despolimerizantes.

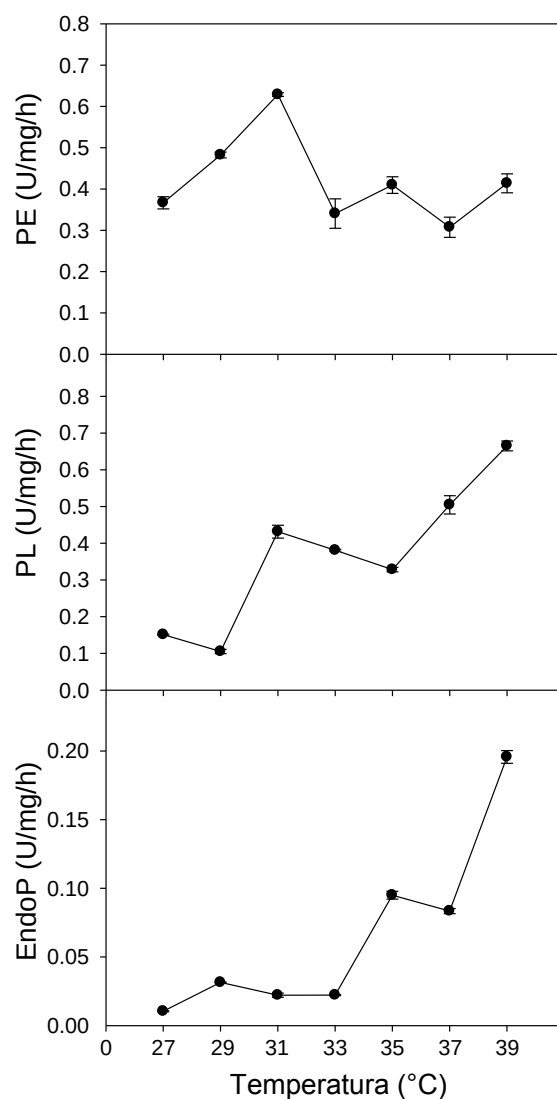


Fig. 1. Efecto de la temperatura en la productividad específica de pectinasas de *Aspergillus* HL atrapado en alginato de calcio a las 72 h de cultivo.

El efecto del pH en la actividad pectinolítica se evaluó en un rango de 2.5-5.0 (Fig. 2). A pH 3.5 se estimuló la

producción de PL y PE y a pH muy ácido la actividad endoP.

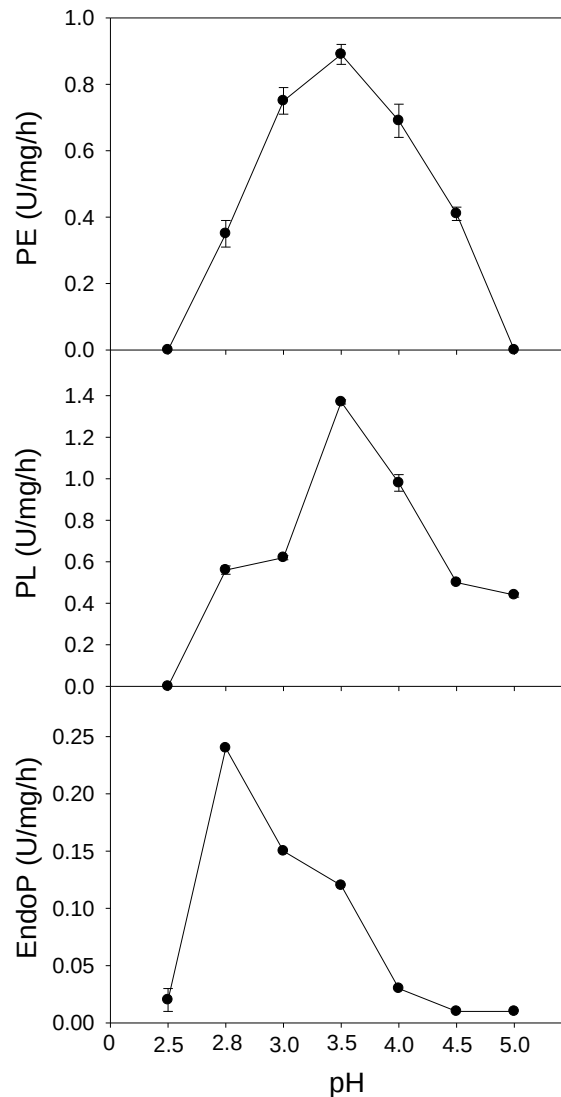


Fig. 2. Efecto del pH inicial sobre la productividad específica de pectinasas de *Aspergillus* HL atrapado en alginato de calcio a las 72 h de cultivo.

Para corroborar la respuesta diferente en la síntesis de pectinasas por pH, se corrieron geles de electroforesis en condiciones desnaturalizantes. El patrón de proteínas cambió con la variación del pH

(Fig. 3), a pH 3.5-5 se detectaron patrones complejos de proteínas, mientras que a pH 2.5-3 se observaron pocas bandas. Este efecto ha sido asociado con la represión causada por el estrés ácido (Aguilar *et al.*,

1991). Los zimogramas muestran a pH 2.8-3.5 una banda intensa que corresponde a la actividad endoP con masa molecular aparente de 45 kDa. En el mismo gel está presente una banda muy oscura de 32 kDa característica de la actividad PE (Downie *et al.*, 1998) que se intensificó a pH 3.5. La actividad “*in situ*” PL se observó a pH 3.5-5 y se estimó una masa molecular aparente de 60 kDa. Los mecanismos que regulan la respuesta al estrés ácido han sido poco estudiados y entre éstos, algunos autores han demostrado que la regulación ocurre a nivel

transcripcional. Por ejemplo, Cotton *et al.* (2003) demostraron que la acidificación progresiva del medio ambiente por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* representa la principal estrategia para la expresión secuencial de enzimas poligalacturonasas como factores de patogenicidad. También se ha identificado que la regulación por pH en *Colletotrichum acutatum* es mediada por el factor transcripcional PacC (dedos de zinc), que activa la expresión de genes en condiciones alcalinas y los reprime en condiciones ácidas (Peñalva & Arst, 2004; You & Chung, 2007).

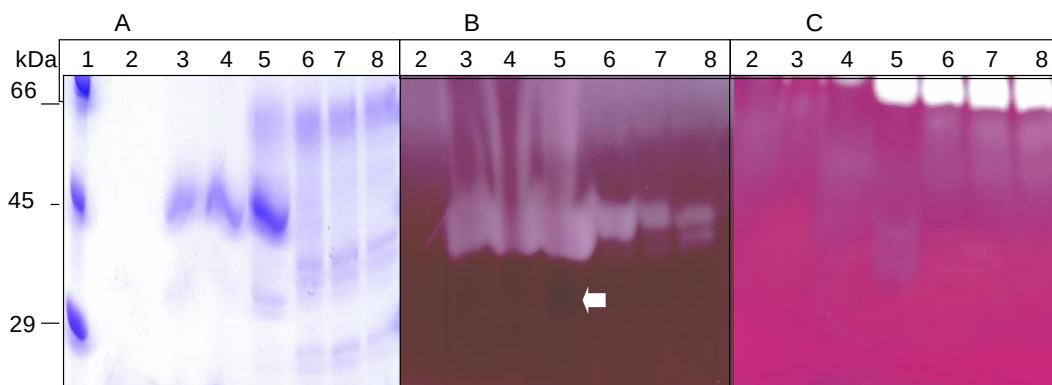


Fig. 3. Geles de electrophoresis SDS-PAGE con extractos producidos por células inmovilizadas de *Aspergillus* HL a diferente pH inicial. Perfiles de proteína (A). Zimogramas de endoP (B) y PL (C). Marcadores de masa molecular (línea 1), pH 2.5 (línea 2), 2.8 (Línea 3), 3 (Línea 4), 3.5 (Línea 5), 4 (línea 6), 4.5 (línea 7), 5 (línea 8).

Cinéticas de producción de pectinasas

El análisis de las cinéticas de producción de pectinasas (39°C y pH 3.0) mostró variación en la respuesta de las células libres y las inmovilizadas. Las células atrapadas aumentaron 8 veces la producción PE y PL con respecto al sistema libre, a las 24 h y 36 h respectivamente (Fig. 4) y una respuesta tardía en la producción de endoP (72 h)

(Reyes *et al.* 2006). Aunque no se ha encontrado un efecto sinérgico entre las enzimas pectinolíticas, el orden de aparición sugiere un efecto cooperativo para degradar la pectina. El crecimiento celular se incrementó notablemente en las células atrapadas en las esferas de alginato de calcio con respecto a las libres. Las esferas mostraron una densa capa de micelio en el exterior, lo cual representó

una mayor área superficial que pudo favorecer el consumo de oxígeno e intercambio de nutrientes y la excreción de enzimas. Los resultados de este trabajo son diferentes con los reportados por Federici *et al.* (1990), quienes detectaron alta producción de glucoamilasas en *Aureobasidium pullulans* a pesar del bajo crecimiento del hongo inmovilizado en

alginato de calcio y lo relacionaron a una mayor estabilización de las glucoamilasas mediante interacciones físico-químicas con el calcio. También, Domínguez-Espinosa & Webb, 2003 atribuyeron el aumento en la producción de enzimas durante el cultivo de células inmovilizadas al incremento en la actividad metabólica y la protección a daño mecánico.

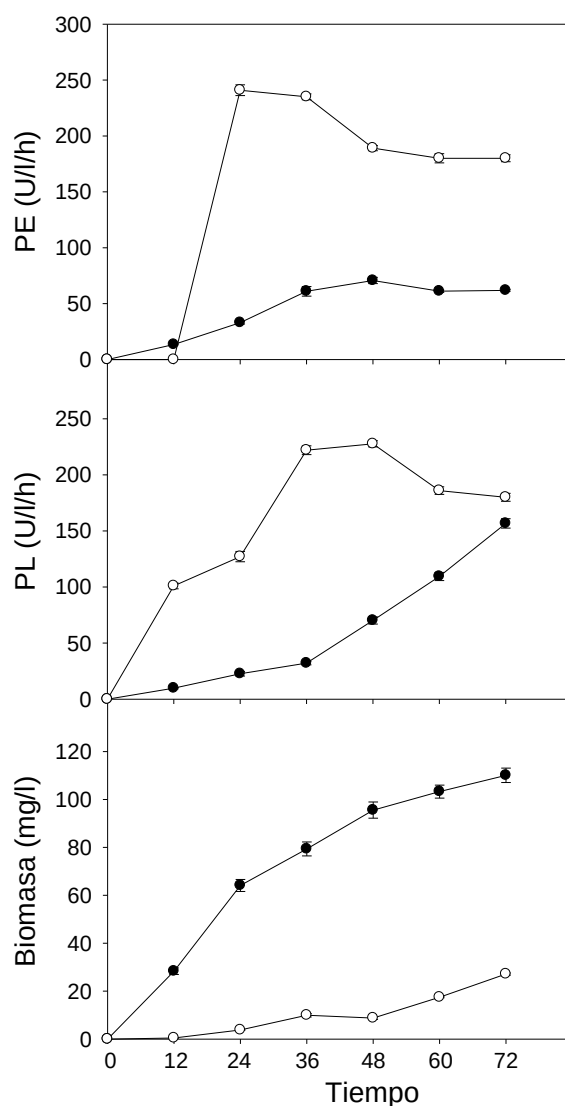


Fig. 4. Curvas de producción de pectinasas y biomasa por células inmovilizadas (●) y células libres (○) a pH 3 y 39°C.

Una ventaja de las células inmovilizadas con respecto a los cultivos convencionales libres es la capacidad de reuso. Recientemente Gattás *et al.* (2009) inmovilizaron esporas de *Aspergillus* sp. en alginato de calcio que aumentaron la actividad PG y lograron reutilizar el sistema

6 veces. En este estudio, la eficiencia en el reuso del sistema inmovilizado de *Aspergillus* HL fue satisfactorio a lo largo de 23 días, debido a que la productividad volumétrica de endoP, PL y PE aumentó 6, 17 y 17 veces respectivamente, con respecto a las células libres (Tabla 1).

Tabla 1. Reúso de células inmovilizadas de *Aspergillus* HL

Ciclos	Productividad volumétrica (U/l/h)			Biomasa liberada (%)
	endoP	PL	PE	
1	100	152	60	5.7
2	220	1309	270	7.1
3	501	1470	879	7.7
4	739	1551	481	15.9
5	960	1482	480	15.8
6	1530	1478	680	23.7
7	780	490	972	27.7
8	430	0	928	20.7
Total	5260	8040	4760	
CL	870	470	280	

Los extractos enzimáticos de las células libres (CL) se obtuvieron a 39°C y pH 3 a las 144 h y los ciclos de reuso fueron de 72 h.

Durante el cultivo semicontinuo (552 h), solo se liberó 27% del micelio al medio de cultivo, lo que indica que las esferas mantuvieron la integridad macánica durante los ciclos de fermentación. Estos resultados contrastan con los descritos en *Aspergillus* 26, en el cual se liberó 40% de la biomasa durante el reuso (Angelova *et al.*, 1998). Se ha propuesto que el atrapamiento en alginato de calcio y el uso repetido, favorece la extensión de las fases de crecimiento exponencial y estacionaria, lo que en consecuencia incrementa la

eficiencia catalítica del biocatalizador (Pashova *et al.*, 1999).

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demostraron que el pH y la temperatura modificaron el perfil de producción de pectinasas de *Aspergillus* HL inmovilizado en alginato de calcio. La alta productividad pectinolítica y la estabilidad mecánica exhibida por las esferas, le confiere a este sistema un potencial para la producción y

aplicación de pectinasas en procesos biotecnológicos.

REFERENCIAS

Aguilar G, Trejo B, García J & Huitron C (1991) Influence of pH on endo- and exo-pectinase production by *Aspergillus* sp. CH -Y- 1043. *Can. J. Microbiol.* 37: 912-917.

Angelova M, Sheremetska P & Lekov M (1998) Enhanced polymethylgalacturonase production from *Aspergillus niger* 26 by calcium alginate immobilization. *Process Biochem.* 33: 299-305.

Botella C, Diaz A, Ory I, Webb C & Blandino A (2007) Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *J. Process Biochem.* 42: 98-101.

Bedouet I, Courtois B & Courtois J (2005) Methods for obtaining neutral and acid oligosaccharides from flax pectins. *Biotechnol. Lett.* 27: 33-40.

Cotton P, Kasza Z, Bruel C, Rascle C & Fevre M (2003) Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiol.* 227: 163-169.

Delgado L, Trejo, Huitron C & Aguilar G (1992) Pectin lyase from *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:515-519.

Downie B, Dirk J, KHadfield KT, Wilkins A, Bennett L & Bradford K (1998) A gel

diffusion assay for quantification of pectin methylesterase activity. *Anal. Biochem.* 264 (1998) 149–157.

Dominguez Espinosa R & Webb C (2003) Production of *Monascus* pigments in wheat based substrates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 329-336.

Favela-Torres E, Volke-Sepúlveda T & Viniegra-González G (2006) Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technol. Biotechnol.* 44: 221–227.

Federici F, Petruccioli M & Mille MW (1990) Enhancement and stabilization of the production of glucoamylase by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans* in a fluidized-bed reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 407-409.

Gattás AL, Bueno RM & Ribeiro HL (2009) Stimulation of polygalacturonase production in an immobilized system by *Aspergillus* sp: effect of pectin and glucose. *Eur. Food Res. Technol.* 229: 923-928.

Jacob N & Prema P (2006) Influence of mode of fermentation on production of polygalacturonase by a novel strain of *Streptomyces lydicus*. *Food Technol. Biotechnol.* 44: 263–267.

Jayani RS, Saxena S & Gupta R (2005) Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.* 42: 98-101.

Kashyap DR, Vohora PK, Chopra S & Tewari R (2001) Applications of pectinases in the commercial sector. A review. *Biores. Technol.* 77: 215-227.

- Kertesz ZI (1937) Pectic enzymes. The determination of pectin methoxylase activity. *J. Biol. Chem.* 121: 589-598.
- Larios G, García J & Huitron C (1989) Endopolygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Biotechnol. Lett.* 11: 729-734.
- Manderson K, Pinart M, Tuohy KM, Grace WE, Hotchkiss AT, Widmer W, Yadhav MP, Gibson GR & Rastall RA (2005) *In vitro* determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8383-8389.
- Mwenje E & Ride JP (1996) Morphological and biochemical characterization of *Armillaria* isolates from Zimbabwe. *Plant Pathol.* 45:1036-1051.
- Olsson L, Christensen TMI, Hanson PK & Palmquist AE (2003) Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *T. reesei* RUT C-30. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 612-619.
- Pashova S, Slokoska L, Sheremetska P, Krumova E., Vasileva L & Angelova M (1999) Physiological aspects of immobilised *Aspergillus niger* cells producing polymethylgalacturonase. *Process Biochem.* 35: 15-19.
- Peñalva M & Arst J (2004) Recent advances in the characterization of ambient of pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 58: 424-451.
- Phutela U, Dhuna V, Sandhu S & Chadha BS (2005) Pectins and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. *Braz. J. Microbiol.* 36: 63-69.
- Piccoli-Valle RH, Silva DO, Passos VT & Passos LMF (2001). Production of Pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. *Braz. J. Microbiol.* 32 doi:10.1590/S1517-83822001000200013.
- Reyes N, Rivas-Ruiz I, Domínguez-Espinosa R & Solís S (2006) Influence of immobilization parameters on endopolygalacturonase productivity and gel bead mechanical resistance by hybrid *Aspergillus* HL entrapped in calcium alginate. *Biochem. Eng. J.* 32: 43-48.
- Sadhana N, Yashdeep P, Divya S, Ananad N & Anil K (2006) Production polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inductor. *Process Biochem.* 41: 1136-1140.
- Solís S, Loeza J, Segura G, Tello J, Reyes N, Lappe P, Gutiérrez L & Huitrón C (2009) Hydrolysis of orange peel by a pectin lyase overproducing hybrid obtained by protoplast fusion between mutant pectinolytic *Aspergillus flavipes* and *Aspergillus niger* CH-Y-1043. *Enzyme Microb. Technol.* 44: 123-128.
- Taragano VM & Pilosof MR (1999) Application of Doehlert designs for water activity, pH and fermentation

Artículos

time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 411-419.

You B & Chung K (2007) Phenotypic characterization of mutants of the citrus pathogen *Colletotrichum acutatum* defective in a PacC-mediated pH regulatory pathway. *FEMS Microbiol. Lett.* 277:107–114.

El Potencial de las Plantas para Suministrar Materia Prima para la Producción de Biocombustibles

Víctor M. Loyola-Vargas, Jorge Luis García-Almada, María Teresa Cadenas-González y Rosa M. Galáz-Ávalos

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán, México *Correo electrónico vmloyola@cicy.mx

RESUMEN

Los biocombustibles surgen como opción para mitigar los efectos antropocéntricos sobre el cambio climático, afectado principalmente por gases de efecto invernadero. En la última década se ha visto un marcado incremento en la utilización de biocombustibles como bioetanol y biodiesel, siendo la Unión Europea el principal productor y consumidor de biodiesel, mientras que EUA y Brasil lo son para el caso del bioetanol. Sin embargo, para que estas tecnologías contribuyan significativamente al desarrollo sustentable, es necesario implementarlas a una escala mayor. En este sentido, toma importancia el aprovechamiento de materias primas lignocelulósicas para obtener bioetanol y especies como *Jatropha curcas* para aprovechar tierras marginales y generar biodiesel a partir de los aceites contenidos en sus semillas, así como el uso de microorganismos modificados. Para el caso de *J. curcas*, si bien es cierto que puede sobrevivir en condiciones poco favorables para la agricultura, los rendimientos de producción de aceites son muy bajos. Para que *J. curcas* tenga éxito como cultivo energético será necesario generar variedades con mayor resistencia a condiciones de poca humedad, bajas temperaturas y plagas, también es muy importante optimizar las vías de biosíntesis de ácidos grasos en las semillas de *J. curcas* para que produzcan aceites que permitan obtener biodiesel de mejor calidad.

Palabras clave: biocombustibles, bioetanol, biodiesel, *Jatropha curcas*.

ABSTRACT

Biofuels arise as an option to mitigate anthropocentric effects on climate change, mainly affected by greenhouse gases. The use of biofuels has been increasing in the last decade, with the EU as the largest producer and consumer of biodiesel, while United States and Brazil for bioethanol. Nevertheless, a larger scale implementation of these technologies is needed to contribute significantly to sustainable development. In this sense, becomes important the use of lignocellulosic feedstocks for bioethanol production and species as *Jatropha curcas* to use

marginal land to generate biodiesel, as well as modified microorganisms. The development of varieties with increased resistance to drought, low temperatures and pests is needed for the success of *J. curcas* as an energy crop, also is very important optimize the fatty acids biosynthesis pathway in *J. curcas* seeds to obtain better biodiesel quality.

Keywords: biofuels, bioethanol, biodiesel, *Jatropha curcas*.

INTRODUCCIÓN

Nuestro clima está cambiando y ahora hay un reconocimiento científico, social y político de que es consecuencia del aumento antropocéntrico de los gases de invernadero. Los biocombustibles, combustibles derivados de materiales vegetales, tienen el potencial de aportar parte de la solución para la disminución de dichas emisiones. Los biocombustibles provienen de fuentes renovables que pueden ser cultivadas en muy diferentes ambientes (Pickett, 2008). La importancia de las fuentes de energía renovable está aumentando a medida que las presiones medio-ambientales y geopolíticas incentivan a los gobiernos a buscar alternativas a los combustibles fósiles. Sin embargo, las fuentes de energía renovables, son más caras que las fuentes fósiles, y sólo han sido desarrolladas exitosamente en mercados que brindan suficientes incentivos para éstas, como es el caso de Alemania y España, en donde existen estímulos asociados a la tarifa que admiten el desarrollo de proyectos rentables (Edgard, 2011).

En la última década se ha presentado un crecimiento exponencial en la producción mundial de biodiesel y bioetanol, que ha pasado de 30 PJ en el año 2000, a 572 PJ en el año 2009 para el

caso del biodiesel, siendo la Unión Europea (UE) el principal productor y consumidor de este bioenergético. Por otro lado, la producción global de bioetanol ha pasado de 340 PJ en el año 2000 a 1540 PJ en el año 2009, con Estados Unidos de América (EUA) como el principal productor de dicho biocombustible, seguido por Brasil (Lamers *et al.*, 2011).

Hasta el día de hoy el etanol ha sido el biocombustible más utilizado, en parte debido a un amplio conocimiento de sus características y de metodologías bien establecidas para su producción industrial, principalmente para la industria de alimentos y bebidas. Sin embargo, es posible que el etanol no sea la mejor opción como biocombustible, sobre todo debido a ciertos problemas técnicos relacionados con los motores de combustión interna, un ejemplo de esto puede ser su alta solubilidad en agua, lo cual dificulta su purificación y puede generar problemas en los sistemas de combustión, así como su bajo contenido energético —comparado con los combustibles normales— (Elshahed, 2010). En el año 2008 se produjeron alrededor de 87 gigalitros de combustibles líquidos mundialmente, lo cual es casi el volumen de combustible líquido consumido por Alemania el mismo año (Somerville *et al.*,

2010). Esencialmente, todo este combustible fue producido a partir de cultivos desarrollados inicialmente para la producción de alimentos. Es claro que el etanol proveniente de materiales lignocelulósicos es mucho mejor que el etanol que proviene de maíz en términos de los costos ambientales involucrados (Hill *et al.*, 2009) y de la ganancia energética obtenida.

Si las selvas tropicales, turberas, sabanas o pastizales se utilizan para producir biocombustibles se crea un déficit negativo de carbono al liberar entre 17 y 420 veces más bióxido de carbono que las reducciones que estos biocombustibles proporcionarían al desplazar a los combustibles fósiles (Fargione *et al.*, 2008; Scharlemann & Laurance, 2008). En tanto que los biocombustibles obtenidos a partir de desechos agrícolas o provenientes de cultivos sembrados en tierras abandonadas o degradadas prácticamente no tienen impacto en los gases invernadero (Fargione *et al.*, 2008), o incluso pueden disminuir la emisión de este tipo de gases (Sagar & Kartha, 2007). Otro costo ambiental que varía entre los biocombustibles son las emisiones de gases traza. Por ejemplo, los cultivares que requieren fertilizantes nitrogenados, tales como maíz o colza, pueden ser una importante fuente de óxido nítrico.

La expansión actual de los mercados energéticos y como resultado de las nuevas políticas energéticas y medio ambientales, el papel de la agricultura está cambiando. Entre los cambios más

significativos se encuentra la creciente función del sector agrícola como proveedor de materia prima para la producción de biocombustibles líquidos para el transporte -etanol y biodiesel-. El cultivo de plantas para producir bioenergía representa una nueva fuente de demanda para los productos agrícolas (Wiebe *et al.*, 2008). Si bien esta nueva actividad es una promesa para la creación de ingresos y empleo, al mismo tiempo genera una creciente competencia por los recursos naturales, en particular tierra y agua, especialmente en el corto plazo.

La producción actual de biocombustibles basada en azúcar y almidón de cultivos (etanol) y de semillas oleaginosas (biodiésel) se conoce generalmente como biocombustibles de primera generación. Una segunda generación de tecnologías, en desarrollo, también puede hacer posible el uso de materiales lignocelulósicos para la producción de bioetanol. También se encuentran en desarrollo la tercera y cuarta generaciones de biocombustibles, basadas principalmente en el uso de microorganismos modificados genéticamente. En este último caso ya se han modificado microorganismos, como *Escherichia coli*, para producir una mezcla de alcanos (los constituyentes de la gasolina, el biodiésel y el combustible para avión) (Schirmer *et al.*, 2010) o también para producir ésteres de los ácidos grasos (biodiésel) a partir de hemicelulosas como fuente de carbono (Steen *et al.*, 2010).

La celulosa es el material biológico más abundante en la tierra. El desarrollo de una segunda generación de biocombustibles basada en celulosa, podría ampliar significativamente el volumen y la variedad de las materias primas que pueden ser utilizadas para la producción de etanol. Los desechos celulósicos, incluidos los desechos procedentes de la agricultura (paja, tallos y hojas) y la silvicultura, desechos generados a partir de la transformación (cáscaras de nueces, bagazo de caña de azúcar y aserrín) y desechos orgánicos municipales, pueden ser fuentes potenciales de materia prima para la fabricación de biocombustibles. Sin embargo, también es importante considerar el papel crucial que la descomposición de la biomasa juega en mantener la fertilidad y textura del suelo; un retiro excesivo de desechos para la producción de bioenergía podría tener efectos negativos (Carroll & Somerville, 2009; Wiebe *et al.*, 2008).

La segunda generación de materias primas y biocarburos podría también ofrecer ventajas en términos de reducción de emisiones de gases invernadero. La mayoría de los estudios proyectan que en el futuro, los combustibles provenientes de cultivos perennes, maderables y residuos agrícolas podrían reducir drásticamente el ciclo de vida de los gases invernadero en relación con los combustibles derivados del petróleo y a los biocombustibles de primera generación (Wiebe *et al.*, 2008).

¿PUEDEN LOS BIOCOMBUSTIBLES SER PRODUCIDOS EN TIERRAS MARGINALES?

Algunos de los cultivos utilizados para producir biocombustibles pueden tolerar condiciones medio ambientales que no pueden tolerar los cultivos para alimentos y por lo tanto ofrecen la oportunidad de volver productiva una tierra que presenta pocos beneficios económicos. Existen importantes cantidades de tierra marginal que podrían dedicarse a la producción de biocombustibles, reduciendo así el conflicto con los cultivos alimentarios y ofreciendo una nueva fuente de ingreso para los agricultores. El cálculo más reciente sobre el área agrícola global abandonada es de entre 385 y 472 millones de hectáreas (Campbell *et al.*, 2008). Si bien esas tierras podrían ser menos productivas y por lo tanto ser de alto riesgo, su uso para producir biocombustibles podrían producir beneficios secundarios, tales como la restauración de vegetación degradada, secuestro de carbono y servicios ambientales locales (Wiebe *et al.*, 2008).

El manejo de cualquier cultivo en tierras marginales con bajos niveles de agua y nutrientes podría resultar en bajos rendimientos. *J. curcas* y sorgo dulce, que son tolerantes a la sequía, no son la excepción. Para producir niveles de rendimiento comerciales aceptables, las plantas no pueden ser estresadas más allá de ciertos límites: de hecho, estas plantas se beneficiarían de niveles modestos adicionales de agua y nutrientes.

Se ha estimado que en una plantación de *J. curcas* se requieren aproximadamente 20,000 L de agua para producir 1 L de biodiesel, mientras que para obtener 1 L de biodiesel a partir de canola o soja, se requieren alrededor de 14,000 L. Por otra parte, para la obtención de 1 L de etanol, se requieren aproximadamente 1,300 L, 2,500 y 10,000 L cuando se usan remolacha azucarera, maíz y sorgo respectivamente (Gerbens-Leenes *et al.*, 2009). Así, mientras que el mejoramiento de los cultivos puede ofrecer potencial en el largo plazo, nutrimentos adecuados, agua y manejo adecuado son todavía necesarios para asegurar rendimientos económicamente aceptables –implicando que aun los cultivos que crecen en tierras marginales todavía competirán en alguna extensión con cultivos alimenticios por recursos tales como nutrimentos y agua (Wiebe *et al.*, 2008). Adicionalmente, algunos cultivares, como los agaves, producen buenos rendimientos de biomasa en tierras semiáridas (Davis *et al.*, 2011).

BIODIÉSEL

Los aceites vegetales no pueden ser utilizados directamente en los motores de combustión interna, ya que debido a su elevada viscosidad forma fácilmente depósitos de carbono en los motores, lo que resulta en una combustión inadecuada y reduce el nivel de vida del motor. Por ello dichos aceites deben convertirse en biodiésel.

El biodiésel es un combustible limpio que se produce a partir de grasas animales o aceites vegetales, por lo que es renovable y biodegradable. El consumo de aceite por litro proveniente de plantas puede reducir 7.34 kg de CO₂ (Wang *et al.*, 2011). El biodiésel es producido a partir de los ácidos grasos presentes en los triacilglicéridos que se encuentran en las grasas animales o en los aceites vegetales. Los triacilglicéridos están formados de ácidos grasos de cadena larga unidos al glicerol. La reacción de transesterificación consiste en la transformación de los ácidos grasos presentes en los triglicéridos en los alquil ésteres de los ácidos grasos en presencia de monoalcoholes de cadena corta (normalmente los alcoholes metílico o etílico), un catalizador, ácido o alcalino, a temperatura elevada, y en glicerol como producto secundario (Fig. 1) (Hoydoncx *et al.*, 2004; Moser, 2009). La mezcla de alquil ésteres obtenida forma el biodiésel. La reacción química de esterificación permite que la mezcla de ácidos grasos adquieran las propiedades físico-químicas que se requieren para el funcionamiento de los motores sin que se presente ningún problema en ellos y cumpla con los estándares establecidos por la American Society for Testing and Materials (ASTM), en la norma ASTM D 6751 (ASTM, 2007), y su correspondiente en Europa, la norma EN 14214 (CEN, 2003). Con su relativamente bajo perfil de emisión, el biodiésel, es un combustible ideal para usar en ambientes sensibles, tales como las

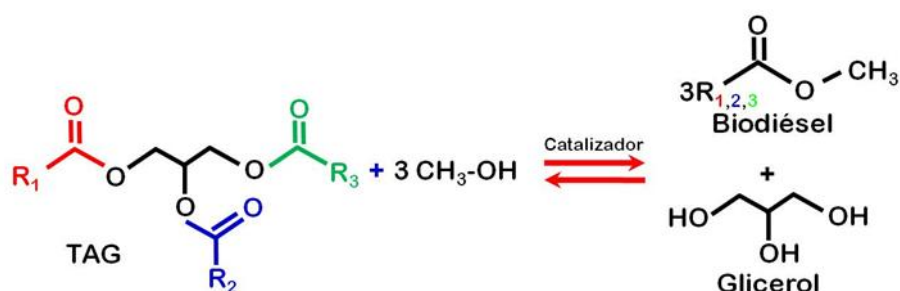


Fig. 1. La transesterificación de los triacilgliceroles (TAG) produce los alquil ésteres de los ácidos grasos (biodiésel).

ciudades altamente contaminadas (Vasudevan & Briggs, 2008).

Si bien existe una explosión de información relacionada con las publicaciones sobre biodiesel, aún existen varios problemas sin resolver; éstos van desde aspectos económicos, hasta aspectos sociales y técnicos. Por ello, la industria del biodiesel se encuentra bajo el ataque de algunas asociaciones ecologistas, y los subsidios para la producción de biocombustibles han sido condenados por algunos gobiernos. El biodiesel tiene que aumentar su popularidad entre los movimientos sociales y gobiernos para constituir una alternativa válida de fuente de energía (Pinzi *et al.*, 2009).

Hay varios retos técnicos que necesitan ser resueltos para hacer al biodiésel rentable. En primer lugar, el elevado costo de los aceites vegetales debe reducirse (Openshaw, 2000). Para ello deberán emplearse materias primas de bajo costo, tales como aceites no comestibles, aceites

residuales del procesamiento de los alimentos y grasas animales. Sin embargo, las relativamente grandes cantidades de ácidos grasos libres y el agua en estas materias primas redundan en la producción de jabón en presencia de un catalizador alcalino. Para ello se requieren pasos adicionales para eliminar el agua y los ácidos grasos libres de la mezcla de reacción (Vasudevan & Briggs, 2008).

El desarrollo de aceites vegetales como combustibles líquidos tiene varias ventajas sobre otras alternativas de producción de combustible, tales como: a) las tecnologías para la extracción y procesamiento son simples y fáciles, ya que sólo se requiere equipo convencional con poco consumo de energía; b) las propiedades del combustible son muy semejantes a las del diésel inorgánico; c) los aceites vegetales son renovables; d) puesto que son líquidos, estos aceites son fáciles de transportar y también son estables y no peligrosos; e) el subproducto de la extracción de los aceites es rico en proteínas y puede ser empleado como alimento para ganado o combustible

sólidos; f) el cultivo de las plantas que producen estos aceites se puede llevar a cabo en un amplio rango de localizaciones geográficas y condiciones climáticas; g) el biodiésel puede usarse directamente en motores de ignición por compresión sin necesidad de modificaciones sustanciales en el motor; y h) el biodiésel no contiene azufre, por lo que no se producen óxidos de azufre (Dorado, 2008).

Actualmente, para la producción de biodiésel se usa principalmente aceite de semillas de soya, girasol, colza y algodón (Chang *et al.*, 1996; Karmee *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2008), *Ricinus communis* y camelina. Sin embargo, *J. curcas* y *Pongamia pinnata* Pierre son las plantas preferidas sobre otras materias primas en los países tropicales.

La elaboración de biocombustibles de primera generación, cuya materia prima son los cultivos agrícolas, tienen un efecto negativo en la seguridad alimentaria si se produce en cantidades elevadas. No obstante, utilizar la biomasa obtenida de cultivos no agrícolas como materia prima para producir biocombustibles de segunda generación resulta más favorable para la protección del medio ambiente y la seguridad alimentaria, en contraste con los de primera generación. Actualmente se considera muy prometedor al cultivo de *J. curcas* como materia prima para biodiesel de segunda generación.

JATROPHA

Entre todos los cultivos que producen aceite, *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) (Fig. 2), ha emergido como la principal

materia prima para la industria del biodiésel con grandes inversiones para su investigación y desarrollo, procesado y conversión en biodiésel (Rajagopal, 2008). *J. curcas* es una planta multipropósitos con diversos atributos y considerable potencial como fuente para la producción de biodiésel (Openshaw, 2000). Sin embargo, se conoce poco para hacerla una planta exitosa. Es un arbusto perenne leñoso que se encuentra ampliamente disperso a través de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. La planta es medianamente tolerante a la sequía, crece bien en suelos marginales, necesita sólo una lluvia moderada, se establece fácilmente y puede ayudar a recuperar suelos erosionados y crece rápidamente (Wiebe *et al.*, 2008). La planta vive hasta 50 años y fructifica anualmente por más de 30 años (Francis *et al.*, 2005).

Se requieren alrededor de 300 a 350 frutos para obtener un kilo de semilla (Catzin & Loyola-Vargas, datos no publicados). Las semillas de *Jatropha* rinden aproximadamente de 6 a 8 TM ha⁻¹ y contienen entre 20 y 40% (p/p) de aceite (Aminul Islam *et al.*, 2012; Annarao *et al.*, 2008; Gübitz *et al.*, 1999). El grano contiene entre 20 y 50% de aceite. Si bien se ha dado un gran énfasis en la producción de biodiesel, no se ha dado la debida atención para el aprovechamiento de los otros componentes de la fruta con fines energéticos (Singh *et al.*, 2008).

Los muchos usos de *Jatropha* incluyen la recuperación de suelos marginales y la

Artículos



Fig. 2. Diferentes vista de la planta *Jatropha curcas* L. Panel superior izquierdo, producción de plántulas para su uso en plantación. Panel central superior, una planta de *Jatropha*. Panel superior derecho, flores. Panel inferior izquierdo, frutos. Panel central inferior, un fruto abierto en el que se muestra la presencia de tres semillas. Panel inferior derecho, semillas secas de las cuales se extrae el aceite para la producción del biodiésel.

producción de forraje, jabón, cera, cosméticos, pesticidas y fármacos anticáncer (Mampane *et al.*, 1987; Openshaw, 2000; Staubmann *et al.*, 1999). También es útil para cocinar y para generar electricidad (Wiebe *et al.*, 2008); previene la deforestación y la desertificación y provee fertilidad al suelo (Rajagopal, 2008). Puede crecer en suelos pedregosos o arenosos con un contenido bajo de nutrimentos, casi sin suministros extras (Li *et al.*, 2008) y no requiere de un régimen nutricional especial. Los aspectos primarios que favorecen a *Jatropha* sobre otros cultivos incluyen el hecho de que existe por lo menos una variedad no comestible. La

planta y las semillas de *Jatropha* no son comestibles y son tóxicas para los animales. La toxicidad de la semilla se debe a la presencia de curcina y de ésteres de forbol (Aminul Islam *et al.*, 2012).

El aceite de *Jatropha*, contiene predominantemente ácidos oleico (C18:1) y linoleico (C18:2) los cuales constituyen del 72 al 80% de los ácidos grasos totales (Banerji *et al.*, 1985). El contenido de ácidos grasos libres puede variar entre 0.4% y 2.3% y el valor promedio de calentamiento está alrededor de 40 MJ kg⁻¹ (Aminul Islam *et al.*, 2012). Esta composición de ácidos grasos en los triacilglicéridos de *Jatropha* produce un

biodiésel con un índice de cetano con valores que van desde un promedio de 39.5 en cultivares del sureste asiático (Aminul Islam *et al.*, 2012) a un promedio de 52.9 para genotipos seleccionados (Aminul Islam *et al.*, 2012).

GENOMA

El cariotipo de *J. curcas* se obtuvo del meristemo radical e indica la presencia de 22 cromosomas relativamente pequeños, tanto metacéntricos como submetacéntricos, en un rango de 1.71 a 1.24 μm . Su genoma es del tamaño del de arroz, la citometría de flujo indica un valor 2C promedio de 0.85 pg y una composición GC de 38.7% (Carvalho *et al.*, 2008).

Además de los genes que codifican enzimas para la biosíntesis de los aminoácidos, se han empezado a estudiar otros genes que están involucrados en la respuesta al estrés de la planta. Entre éstos el primero fue uno que se denominó *JcERF*¹. La secuencia de aminoácidos de la clona *JcERF* es similar al dominio de unión a ADN, AP2/EREBP. El gene se induce rápidamente bajo condiciones de salinidad, sequía, daño mecánico y tratamiento con etileno, mientras que no se observaron cambios significativos con el tratamiento de ABA. La proteína producto del gene *JcERF* se une específicamente a la caja GCC así como al motivo c/DRE. La sobre-expresión del gene *JcERF* en *A. thaliana* aumenta la tolerancia a la sal y a la

sequía. Mientras que la germinación de las semillas transgénicas no se ve afectada por varias concentraciones de ABA en medio MS. Estos datos sugieren que *JcERF* funciona como un factor de transcripción (Tang *et al.*, 2007).

Dado que *Jatropha* posee algunos caracteres indeseables que limitan su uso de una manera más amplia, es deseable tener herramientas a la mano que permitan solucionar este problema. El uso del vector Tobacco Rattle Virus (TRV) puede inducir el silenciamiento de genes en *Jatropha*. Esta técnica se ha empleado para investigar la posible función de 13 genes de *Jatropha* de varias categorías funcionales, incluyendo la biosíntesis de los ácidos grasos, la regulación del desarrollo y la biosíntesis de toxinas (Ye *et al.*, 2009). Otra estrategia ha sido la generación de ²ESTs. Recientemente se han generado 13,249 ESTs de semillas en desarrollo y durante su germinación. Esta estrategia ha permitido la identificación de ESTs que codifican para proteínas que están involucradas en la toxicidad de las semillas de *Jatropha* (Costa *et al.*, 2010).

Otra alternativa ha sido la de construir una biblioteca de ADNc de semillas de *J. curcas*. Esta biblioteca contiene 106 clonas con un tamaño promedio del inserto de 2.1 kb. Se secuenciaron 12,084 ESTs con una longitud promedio de 576 pb. El

¹ERF = Ethylene-responsive element binding-factors.

²ESTs = Expressed Sequence Tags.

análisis de los contigs³ indica que hay 2,258 y 4,751 singletons⁴. El tamaño de los contigs se encuentra en el rango de 2-23 y se determinaron 7,333 ESTs en ellos. Esto resulta en 7,009 unigenes los cuales fueron anotados mediante BLASTX. Este análisis mostró la presencia de 3,982 unigenes con similaridad significativa a genes conocidos y 2,836 unigenes con similaridad a genes desconocidos. Los sobrantes 191 unigenes que no muestran similaridad con ningún gene puede ser que codifiquen para genes únicos. El análisis muestra que los unigenes están relacionados a un amplio rango de funciones celulares, moleculares y biológicas. Entre los 7,009 unigenes, 6,233 unigenes fueron identificados con potencial de ser genes completos (Natarajan *et al.*, 2010). Otro grupo creó una biblioteca BIBAC⁵ del cultivar YN049-4 de *J. curcas*. Consiste de 30,720 clonas, 92.1% de las cuales contienen ADN de *Jatropha* con un tamaño promedio de 131.9 kb. Se estima que la biblioteca representa alrededor de 8.9 equivalentes del genoma haploide de la planta (Fu *et al.*, 2011).

En relación con la secuencia completa del genoma de *J. curcas*, se han secuenciado tanto el genoma nuclear como el genoma del cloroplasto. En el caso de la

secuencia del genoma del cloroplasto se utilizó la técnica de pirosecuenciación y los faltantes se llenaron utilizando la técnica de Sanger. La molécula circular del ADN cloroplástico contiene 163,856 pb y codifica para 110 genes (78 proteínas, 4 ARNr y 29 diferentes ARNt). La organización y arreglo de su genoma es similar a la reportada para el genoma del cloroplasto de otras angiospermas. Sin embargo, en *Jatropha*, el gene *infA* y los genes *rps16* no son funcionales. El límite de las repeticiones invertidas está dentro del gene *rpl2* y los 13 nucleótidos al final de los genes duplicados son diferentes (Asif *et al.*, 2010).

En mayo del año 2009 se hizo el anuncio de que se había llevado a cabo la primera secuenciación del genoma de *Jatropha* por el grupo de Craig Venter⁶; la secuencia no es pública. Una segunda secuenciación fue anunciada en agosto del año 2010 por Life Technologies Corporation⁷. En diciembre del mismo año, un grupo de investigadores japoneses hizo pública una tercera secuenciación de *Jatropha* (Sato *et al.*, 2011). La longitud de las secuencias no-redundantes fue de 285,858,490 pb y contiene 120,586 contigs y 29,831 singletons lo que abarca el 95% de las regiones del genoma que tienen genes que codifican. El contenido G/C fue de 34.3%. Se dedujeron un total de 40,929

³Contig = De "contiguous" es un conjunto de segmentos de ADN que se superponen provenientes de una sola fuente genética.

⁴Singleton = Un gene o marcador único que identifica una región en el genoma.

⁵BIBAC = Binary Bacterial Artificial Chromosome.

⁶<http://www.genomeweb.com/sequencing/synthetic-genomics-acgt-use-sanger-454-sequence-jatropha-genome>.

⁷<http://domesticfuel.com/2010/08/24/biofuel-biotech-companies-sequence-jatropha-genome/>.

genes completos o parciales. El 4% de los genes que codifican para proteínas (1,529) son específicos de la familia Euphorbiaceae⁸.

La presencia de ARNmi también está bajo escrutinio en *Jatropha*. Recientemente se ha reportado la caracterización de 48 ARNmi de plantas de *Ricinus communis*, *Manihot esculenta*, *Hevea brasiliensis* y *J. curcas* que han sido sometidas a extremos de sequía y frío y durante su recuperación (Zeng *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

Jatropha y otros cultivares tiene un futuro prometedor como fuentes para la producción de biocombustibles. Sin embargo, antes de que se puedan convertir en plantas de uso rutinario para la obtención de biocombustibles deberán completarse una serie de estudios. En primer lugar se requerirán avances en diversas áreas de la ciencia y la ingeniería así como el desarrollo sustentable de los cultivos. Entre los conocimientos más importantes que se requieren está el del proceso de biosíntesis de los ácidos grasos que dan origen a los triacilglicéridos presentes en el aceite que se almacena en sus semillas. El conocimiento de la ruta anabólica y de los genes que codifican para las enzimas que participan en dicho proceso, permitirá su modificación. En este sentido, recientemente se ha reportado la

modificación de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos en semillas de *J. curcas*, logrando disminuir la producción de ácido linoleico y aumentar la síntesis de ácido oleico (Qu *et al.*, 2012).

También, deberá ponerse atención a la susceptibilidad de estas plantas a diversas enfermedades y condiciones climáticas extremas y darles resistencia a bajas temperaturas y otros extremos ambientales. Este hecho les permitiría crecer en tierras aún menos usadas por cultivos de uso agrícola convencional.

El tercer aspecto de importancia, es la creación de variedades con caracteres deseados fijos. Ello permitirá la producción de híbridos con aún mejores características, tanto agronómicas como de productividad y calidad.

En suma, los estudios actuales muestran que el cultivo de plantas para la producción de biocombustibles, en suelos no agrícolas y que no compitan con la producción de comestibles, es posible. Para ello se deberán promulgar leyes y decretos que faciliten su implementación por la sociedad. También deberán desarrollarse programas de investigación que abarquen aspectos de la investigación, desde el conocimiento biológico de las plantas, hasta su uso como fuente de aceite para biocombustibles, pasando por la generación de variedades e híbridos de importancia agronómica. Todo ello permitirá que las plantas contribuyan de manera significativa al desarrollo de energías sustentables y a la atenuación del cambio climático.

⁸ La secuencia e información adicional se encuentra en:
<http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo del laboratorio de los autores ha tenido el financiamiento parcial de la BioRed (Conacyt).

REFERENCIAS

- Aminul Islam A, Yaakob Z, Anuar N, Primandari S & Osman M (2012) Physiochemical properties of *Jatropha curcas* seed oil from different origins and candidate plus plants (CPPs). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 89: 293-300.
- Annarao S, Sidhu OP, Roy R, Tuli R & Khetrapal CL (2008) Lipid profiling of developing *Jatropha curcas* L. seeds using ^1H NMR spectroscopy. *Biores. Technol.* 99: 9032-9035.
- Asif M, Mantri S, Sharma A, Srivastava A, Trivedi I, Gupta P, Mohanty C, Sawant S & Tuli R (2010) Complete sequence and organisation of the *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) chloroplast genome. *Tree Gen. Genom.* 6: 941-952.
- ASTM (2007) American Society for Testing and Materials. D 6751 - Standard Specification for Biodiesel Fuel (B100) Blend Stock for Distillate Fuels. In: Annual Book of ASTM Standards, V. 05.04, Anonymous. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- Banerji R, Chowdhury AR, Misra G, Sudarsanan G, Verma SC & Srivastava GS (1985) *Jatropha* seed oils for energy. *Biomass.* 8: 277-282.
- Campbell JE, Lobell DB, Genova RC & Field CB (2008) The global potential of bioenergy on abandoned agriculture lands. *Environ. Sci. Technol.* 42: 5791-5794.
- Carroll A & Somerville C (2009) Cellulosic biofuels. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 165-182.
- Carvalho CC, Clarindo WR, Prac MM, Santos Araújo FS & Carels N (2008) Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. *Plant Sci.* 174: 613-617.
- CEN (2003) EN 14214 Automotive Fuels: FAME for Diesel Engines; Requirements and Test Methods. In: European Committee for Standardization (CEN), Anonymous. Brussels, Belgium.
- Chang DYZ, Van Gerpen JH, Lee I, Jonson IA, Hammond EG & Marley SJ (1996) Fuel properties and emissions of soybean oil esters as diesel fuel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 1549-1555.
- Costa G, Cardoso K, Del Bem L, Lima A, Cunha M, de Campos-Leite L, Vicentini R, Papes F, Moreira R, Yunes J, Campos F & Da Silva M (2010) Transcriptome analysis of the oil-rich seed of the bioenergy crop *Jatropha curcas* L. *BMC Genomics.* 11: 462.
- Davis SC, Dohleman FG & Long SP (2011) The global potential for Agave as a biofuel feedstock. *GCB Bioenergy.* 3: 68-78.
- Dorado MP (2008) Raw materials to produce low-cost biodiesel. In: Biofuels refining and performance, Nag A (ed). McGraw Hill, United States of America. pp. 107-147.

Artículos

- Edgard G (2011) Assessing the sustainability of biofuels: A logic-based model. *Energy*. 36: 2089-2096.
- Elshahed MS (2010) Microbiological aspects of biofuel production: Current status and future directions. *J. Adv. Res.* 1: 103-111.
- Fargione J, Hill J, Tilman D, Polasky S & Hawthorne P (2008) Land clearing and the biofuel carbon debt. *Science*. 319: 1235-1238.
- Francis G, Edinger R & Becker K (2005) A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. *Nat. Res. Forum*. 29: 12-24.
- Fu Y, Scheuring C, Wang H, Zhang Hb & Wang W (2011) Construction and characterization of a BIBAC library of *Jatropha curcas* L. and identification of BIBAC clones containing genes associated with fatty acid metabolism. *Mol. Breed*. 28: 559-567.
- Gerbens-Leenes W, Hoekstra AY & van der Meer TH (2009) The water footprint of bioenergy. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 106: 10219-10223.
- Gübitz GM, Mittelbach M & Trabi M (1999) Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Biores. Technol.* 67: 73-82.
- Hill J, Polasky S, Nelson E, Tilman D, Huo H, Ludwig L, Neumann J, Zheng H & Bonta D (2009) Climate change and health costs of air emissions from biofuels and gasoline. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 106: 2077-2082.
- Hoydoncx HE, De Vos DE, Chavan SA & Jacobs PA (2004) Esterification and transesterification of renewable chemicals. *Top. Catal.* 27: 83-96.
- Karmee SK, Mahesh P, Ravi P & Chadha A (2004) Kinetics study of the base catalyzed transesterification of monoglycerides from *pongamia* oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81: 425-430.
- Lamers P, Hamelinckb C, Junginger M & Faaij A (2011) International bioenergy trade-A review of past developments in the liquid biofuel market. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 15: 2655-2676.
- Li M, Li H, Jiang H, Pan X & Wu G (2008) Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 92: 173-181.
- Mampane KJ, Joubert PH & Hay IT (1987) *Jatropha curcas*: use as a traditional Tswana medicine and its role as a cause of acute poisoning. *Phytoth. Res.* 1: 50-51.
- Moser B (2009) Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant.* 45: 229-266.
- Natarajan P, Kanagasabapathy D, Gunadayalan G, Panchalingam J, Shree N, Sugantham P, Singh K & Madasamy P (2010) Gene discovery from *Jatropha curcas* by sequencing of ESTs from normalized and full-length enriched cDNA library from developing seeds. *BMC Genomics*. 11: 606.

Artículos

- Openshaw K (2000) A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass Bioenerg.* 19: 1-15.
- Pickett J (2008) Sustainable biofuels: prospects and challenges. The Royal Society, London.
- Pinzi S, Garcia IL, Lopez-Gimenez FJ, Luque de Castro MD, Dorado G & Dorado MP (2009) The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: A review of social, economical and technical implications. *Energ. Fuel.* 23: 2325-2341.
- Qu J, Hui-Zhu M, Wen C, Shi-Qiang G, Ya-Nan B, Yan-Wei S, Yun-Feng G & Ye J (2012) Development of marker-free transgenic *Jatropha* plants with increased levels of seed oleic acid. *Biotechnonology for Biofuels.* 5: 10.
- Rajagopal R (2008) Best practices for long-term *Jatropha* development. KnowGenix, Mumbai, India.
- Sagar AD & Kartha S (2007) Bioenergy and sustainable development? *Annu. Rev. Env. Res.* 32: 131-167.
- Sato S, Hirakawa H, Isobe S, Fukai E, Watanabe A, Kato M, Kawashima K, Minami C, Muraki A, Nakazaki N, Takahashi C, Nakayama S, Kishida Y, Kohara M, Yamada M, Tsuruoka H, Sasamoto S, Tabata S, Aizu T, Toyoda A, Shin-i T, Minakuchi Y, Kohara Y, Fujiyama A, Tsuchimoto S, Kajiyama S, Makigano E, Ohmido N, Shibagaki N, Cartagena JA, Wada N, Kohinata T, Atefeh A, Yuasa S, Matsunaga S & Fukui K (2011) Sequence analysis of the genome of an oil-bearing tree. *Jatropha curcas* L., *DNA Res.* 18: 65-76.
- Scharlemann JPW & Laurance WF (2008) How green are biofuels? *Science.* 319: 43-44.
- Schirmer A, Rude MA, Li X, Popova E & del Cardayre SB (2010) Microbial biosynthesis of alkanes, *Science.* 329: 559-562.
- Scott P, Pregelj L, Chen N, Hadler J, Djordjevic M & Gresshoff P (2008) *Pongamia pinnata*: An untapped resource for the biofuels industry of the future. *Bioener. Res.* 1: 2-11.
- Singh RN, Vyas DK, Srivastava NSL & Narra M, (2008) SPRERI experience on holistic approach to utilize all parts of *Jatropha curcas* fruit for energy. *Renew. Ener.* 33: 1868-1873.
- Somerville C, Youngs H, Taylor C, Davis SC & Long SP (2010) Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science.* 329: 790-792.
- Staubmann R, Ncube I, Gübitz GM, Steiner W & Read JS (1999) Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. seeds. *J. Biotechnol.* 75: 117-126.
- Steen EJ, Kang Y, Bokinsky G, Hu Z, Schirmer A, McClure A, del Cardayre SB & Keasling JD (2010) Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass, *Nature.* 463: 559-562.
- Tang M, Sun J, Liu Y, Chen F & Shen S (2007) Isolation and functional characterization of the *JcERF* gene, a putative AP2/EREBP domain-containing transcription factor, in the woody oil

Artículos

- plant *Jatropha curcas*. *Plant Mol. Biol.* 63: 419-428.
- Vasudevan PT & Briggs M (2008) Biodiesel production: current state of the art and challenges. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 35: 421-430.
- Wang Z, Calderon MM & Lu Y (2011) Lifecycle assessment of the economic, environmental and energy performance of *Jatropha curcas* L. biodiesel in China. *Biomass Bioenerg.* 35: 2893-2902.
- Wiebe K, Croppenstedt A, Raney T, Skoet J, Zurek M, Tschirley J and Cluff M (2008) The state of food agriculture 2008. Biofuels: prospect, risks and opportunities. FAO, Rome.
- Ye J, Qu J, Bui HTN & Chua N-H (2009) Rapid analysis of *Jatropha curcas* gene functions by virus-induced gene silencing. *Plant Biotechnol. J.* 7: 964-976.
- Zeng C, Wang W, Zheng Y, Chen X, Bo W, Song S, Zhang W & Peng M, (2010) Conservation and divergence of microRNAs and their functions in Euphorbiaceous plants. *Nucleic Acids Res.* 38: 981-985.

***Jatropha curcas* una Alternativa para la Obtención de Biodiésel sin Afectar al Sector Alimentario**

Rosa Ma. Galaz-Ávalos, Randy Noé Avilez-Montalvo, Celia Maricruz Ucan-Uc, Javier Adolfo Chan-López y *Víctor M. Loyola-Vargas

*Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán *Correo electrónico vmloyola@cicy.mx*

If biofuels are to help the fight against climate change, they have to be made from more appropriate materials and in better ways¹

RESUMEN

Jatropha curcas L. es una planta multipropósito y de considerable potencial para la producción de biodiésel. El género *Jatropha* es morfológicamente diverso y tradicionalmente se propaga a través de esquejes. En términos agrícolas y beneficios económicos el potencial completo de *Jatropha* está lejos de realizarse. Si este potencial se va a concretar, se requiere de mucha más investigación con la ayuda de herramientas bioquímicas, celulares y moleculares para poder proveer de plantas elite para generar la materia prima para la producción de biodiésel. Las técnicas biotecnológicas pueden ser el pegamento que una todo el conocimiento para introducir las características deseables que son necesarias en *Jatropha* para desarrollar todo su potencial como fuente de biocombustibles.

Palabras clave: biocombustible, *jatropha*, biodiésel,

ABSTRACT

Jatropha curcas L. is a multipurpose plant and considerable potential for biodiesel production. The genus *Jatropha* is morphologically diverse and traditionally propagated through cuttings. In terms of agricultural and economic benefits the full potential of *Jatropha* is far from done. If this potential is to realize, it requires much more research tools with the help of biochemical, cellular and molecular techniques in order to provide the elite raw material for biodiesel production. Biotechnological techniques can be the glue that joins all knowledge to introduce the desirable traits in *Jatropha* that are necessary to realize its full potential as a biofuel source.

Key words: biofuel, *jatropha*, biodiesel.

¹ Tollefson, Nature, 451: 880 – 883, (2008)

INTRODUCCIÓN

El uso de aceites vegetales para mover motores de combustión no es una idea nueva (Songstad *et al.*, 2009). Desde hace más de un siglo se han producido diversos intentos para usarlos como biocombustibles (Knothe, 2005). Rudolf Diesel dedicó los últimos años de su vida a este campo del conocimiento, y en el prólogo del libro que publicó en el año 1913 escribió: "...el uso de aceites vegetales como combustible para motores puede ser insignificante actualmente. Pero dichos aceites pueden llegar a ser, con el curso del tiempo, tan importantes como el petróleo y el carbón lo son hoy en día...." (Diesel, 1913).

En la actualidad, el aceite de semillas de soya, girasol, colza y algodón (Chang *et al.*, 1996; Karmee *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2008), así como de jojaba (*Simmondsia chinensis*), Karanja (*Pongamia pinnata*), Kokum (*Garcinia indica*), Mahua (*Madhuca indica*), Neem (*Azadirachta indica*), Simarouba (*Simarouba glauca*), rábano (*Moringa oleifera*), Tumba (*Citrullus colocynthis*), alcachofa (*Helianthus tuberosus*), higuera (*Ricinus communis*) y *Camelina* spp. está siendo usado para la producción de biodiésel. Sin embargo, *Jatropha curcas* y *Pongamia pinnata* son las plantas con más potencial como materia prima en los países tropicales.

En particular, *Jatropha* y *Pongamia* son plantas que pueden tolerar condiciones medio ambientales que no pueden tolerar los cultivos utilizados para producir

alimentos (Wiebe *et al.*, 2008). Hoy en día existen grandes extensiones de tierra marginal en las que podrían cultivarse estas plantas. Esto permitiría reducir la competencia con cultivos de uso alimentario. Adicionalmente, este tipo de cultivos podrían ayudar con la restauración de vegetación degradada, secuestro de carbono y servicios ambientales locales (Robertson *et al.*, 2008; Tilman *et al.*, 2006; 2009; Wiebe *et al.*, 2008).

JATROPHA

Entre todos los cultivos que producen aceite, *Jatropha curcas* (*Euphorbiaceae*) se ha convertido en una planta con un gran potencial para la industria del biodiésel y en la que se están realizando grandes inversiones para su investigación y para el desarrollo, procesado y conversión en biodiésel (Rajagopal, 2008).

J. curcas (del griego *iatrós* = médico y *trophé* = alimentos) es una planta multipropósitos con muchos atributos y considerable potencial como fuente para la producción de biodiésel (Openshaw, 2000). Sin embargo, se conoce poco para hacerla una planta exitosa. Es un arbusto perenne leñoso (Fig. 1 y 2) cuyo origen se localiza en México y parte de Centroamérica (Deore & Johnson, 2008; Ganesh Ram *et al.*, 2008; Rodríguez-Acosta *et al.*, 2009) y que actualmente se encuentra disperso a través de las regiones tropicales y subtropicales del mundo.

La planta es tolerante a la sequía (Gübitz *et al.*, 1999), está bien adaptada a



Fig. 1. Planta de *J. curcas* en el banco de germoplasma de la UNACH en Villa Flores, Chiapas.

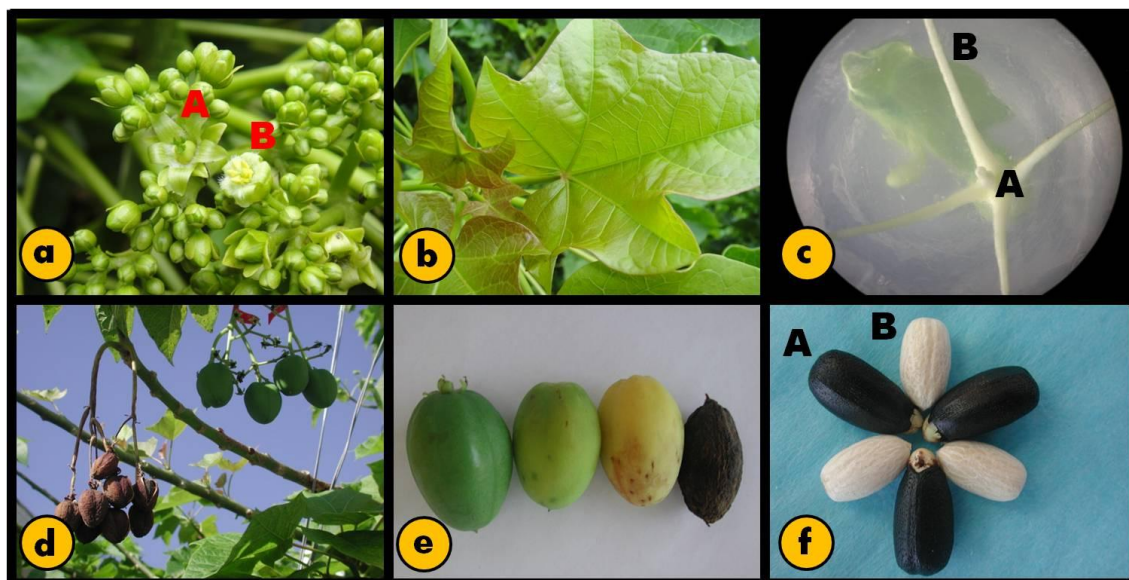


Fig. 2. a) De izquierda a derecha, flores femenina (A) y masculina (B) de *J. curcas*; b) hojas. c) raíz central y raíces periféricas. d) distribución de los frutos. e) cambios de coloración y maduración del fruto. f) semilla con y sin testa.

los suelos semiáridos de las zonas marginales y necesita sólo una lluvia moderada de entre 300 y 1,000 mm por año. Por ejemplo, en estudios realizados en Egipto se ha determinado que sólo necesita de 6 L de agua por semana durante su crecimiento (Abou Kheira & Atta, 2009) y que la composición de los ácidos grasos no cambia con el régimen de irrigación. Gerbens-Leenes *et al.* (2009) han puesto en tela de juicio la viabilidad ecológica de una serie de cultivos que se utilizan para la producción de biocombustibles, *Jatropha* incluida. Sin embargo, Maes *et al.* (2009) han publicado una respuesta en la que se argumenta principalmente que se sobreestimó de manera importante la huella hídrica de *Jatropha*. Por lo tanto, el tema del agua y la producción de biocombustibles es una cuestión abierta a discusión.

Jatropha puede crecer en suelos pedregosos o arenosos con un contenido bajo de nutrientes y casi sin suministros extras (Li *et al.*, 2008b) y no requiere de un régimen nutricional especial. *J. curcas* prefiere el sol directo y es ligeramente tolerante a la salinidad. Su rendimiento y cultivo está limitado por algunos extremos abióticos, especialmente frío y sequía (Adebawale & Adedire, 2006). La planta se establece fácilmente y crece rápidamente (Wiebe *et al.*, 2008). La planta vive hasta 50 años y fructifica anualmente por más de 30 años (Francis *et al.*, 2005). Jongschaap *et al.* (2007) dicen que en escala modesta el cultivo de *Jatropha* puede ayudar a la conservación del agua, recuperación del

suelo, control de la erosión y emplearse para cercas vivas, leña, fertilizante, combustible para alumbrado, producción de jabón, e insecticidas. Otros usos incluyen, la producción de forraje, cera, cosméticos, pesticidas y fármacos anticancerígenos (Mampane *et al.*, 1987; Openshaw, 2000; Staubmann *et al.*, 1999). Su aceite tiene acción purgativa, en enfermedades de la piel y se usa para disminuir el dolor causado por el reumatismo, en tanto que el látex tiene propiedades antimicrobianas (Jongschaap *et al.*, 2007). El extracto de sus hojas es utilizado como un eficaz pesticida (Heller, 1996), en tanto que la decocción de la corteza del tallo sirve como antidisenterico y abortivo (Beyra *et al.*, 2005) cicatrizante, antiséptico, diurético, emético y antiinflamatorio. También es útil para cocinar y para generar electricidad (Kalbande *et al.*, 2008; Wiebe *et al.*, 2008). Otras especies de *Jatropha* también poseen diferentes propiedades medicinales (Sánchez-Medina *et al.*, 2001; Schmeda-Hirschmann *et al.*, 1996; Trebien *et al.*, 1988). Las semillas de *Jatropha* pueden ser procesadas fácilmente (Forson *et al.*, 2004). El valor energético de las semillas de *Jatropha* es de 13.647 kcal g⁻¹ (Banerji *et al.*, 1985).

Las semillas de *Jatropha* (Fig. 2) rinden aproximadamente de 6 a 8 TM ha⁻¹ y contienen entre 20 y 40% de aceite con un patrón de ácidos grasos similar al de los aceites comestibles (Annarao *et al.*, 2008; de Oliveira *et al.*, 2009; Gübitz *et al.*, 1999; Hawash *et al.*, 2009; Om Tapanes *et al.*, 2008). Recientemente, en China se obtuvo

un rendimiento de 66.4% de aceite de sus semillas (Chen *et al.*, 2006). El aceite de *Jatropha*, contiene predominantemente ácidos linoleico y oleico, los cuales constituyen del 72 al 80% de los ácidos grasos totales (Banerji *et al.*, 1985; de Oliveira *et al.*, 2009; Gübitz *et al.*, 1999; Hawash *et al.*, 2009; Om Tapanes *et al.*, 2008). Otros ácidos grasos presentes en el aceite incluyen los ácidos palmítico y estearico (Deore & Johnson, 2008), así como los ácidos caprílico, mirístico, palmitoleico, araquídico, behenico y lignocérico (Ogbobe & Akano, 1993).

El estudio del desarrollo de la semilla de *J. curcas* muestra la presencia de ácidos grasos libres, metil ésteres de ácidos grasos y ésteres de triglicerol junto con pequeñas cantidades de esteroides. Las semillas jóvenes sintetizan predominantemente lípidos polares. Se ha determinado que la síntesis de los lípidos inicia alrededor de tres semanas después de la fertilización (Catzín-Yupit y Loyola-Vargas, datos no publicados). A partir de la cuarta semana las semillas sintetizan activamente triacilglicéridos (Annarao *et al.*, 2008).

A pesar de la considerable inversión en proyectos que se están realizando en diferentes países, no hay disponibles datos científicos confiables de la agronomía de *Jatropha*. La información sobre las relaciones entre rendimiento y variables tales como suelo, clima, manejo y material genético en el cual basar las decisiones de inversión están pobremente documentadas. La evidencia actual muestra un amplio

rango de rendimiento que no pueden relacionarse con parámetros tales como la fertilidad del suelo y la disponibilidad del agua (Jongschaap *et al.*, 2007; Wiebe *et al.*, 2008).

Ciertamente, parece ser que las muchas buenas características que se le atribuyen a *Jatropha* no tienen como base experiencias serias.

La planta

La floración de *Jatropha* es monoica, en la misma inflorescencia están presentes flores masculinas y flores femeninas (Fig. 2a). Las flores son pequeñas, de 6 a 8 mm, con pétalos de 6 a 7 mm de largo. La longitud del pecíolo va entre 6 y 23 mm (Torralba *et al.*, 2008). Son flores verdosas o blanco-amarillas de 10 a 25 cm de largo y con un pedúnculo de 4 a 10 cm (Fig. 2a). Las flores femeninas presentan brácteas acuminadas y las masculinas presentan brácteas aovadas y pedicelos pubescentes. La inflorescencia se forma terminalmente en el eje axial de la hoja en las ramas que rinde un manojo de aproximadamente entre 5 y 10 frutos ovoides o más. Los frutos son cápsulas drupáceas y ovoides, al inicio son carnosos de 2.5 a 4 cm de largo por 2 cm de ancho, elipsoidales y lisas que cuando maduran van cambiando a amarillas (Fig. 2d, e). Para el desarrollo del fruto se necesita 90 días desde la floración hasta la maduración de la fruta (Torralba *et al.*, 2008). El fruto es trilobular (dividido en tres partes) con semillas en cada cavidad, formado por una cáscara dura y leñosa, indehisciente que no se abre para que no salga la

semilla, hasta que llegue la maduración, inicialmente es de color verde, pasando a color amarillo, luego pasa a color café, hasta cambiar un color negro cuando alcanza el estado de maduración (Fig. 2e) (González-Pinacho, 2009). El fruto es grande y produce tres almendras negras cada una llega a medir hasta 2.0 cm de largo por 1.3 de diámetro cuando el fruto está seco. Dentro de la envoltura de la semilla hay una capa cubriendo la almendra; el albumen, blanco oleaginoso, contiene al embrión provisto de dos hojas cotiledonares. La semilla de *Jatropha* pesa de 0.55 a 0.79 pero dependerá de la variedad y los tratamientos que se le dé a la semilla (Fig. 2f). La semilla es cosechada cuando la cápsula está madura y ésta cambia del verde a amarillo, esto ocurre después de dos a cuatro meses desde la fertilización.

Biodiversidad

El género *Jatropha* es morfológicamente diverso y comprende entre 170 y 200 especies, las cuales están distribuidas principalmente en las regiones tropicales secas de América (Deore & Johnson, 2008; Ganesh Ram *et al.*, 2008), 45 de ellas se encuentran en México y el 77% de las especies de *Jatropha* son endémicas de México (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2009). En México *J. curcas*, es la especie con distribución más amplia, se le registra en los estados de Yucatán, Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Puebla, Morelos, Nayarit, Jalisco, Michoacán y Sinaloa (Rodríguez-Acosta *et*

al., 2009). En México ha sido cultivada desde tiempos precolombinos y era conocida y utilizada por los mayas (Toral *et al.*, 2008).

J. curcas recibe diferentes nombres comunes en los países de América Latina, entre otros, piñoncillo, piñón o pistache mexicano (México), curi-i- vai, piñón de leche o piñón botija (Cuba), Tempate (Costa Rica), Pinhao manso (Brasil), piñol (Perú); cotoncillo (Honduras); piñón y tempate (Guatemala y Nicaragua) (Toral *et al.*, 2008). Otros nombres son: coquito, capate, higo del duende, barbasco, higo de infierno, purga de fraile, tua tua, *pinhao manso* etc. y *physic nut* en países angloparlantes. El nombre "tempate" se deriva de un vocablo náhuatl que significa "medicina de la boca", refiriéndose al uso de la savia para curar erupciones de la boca. En la península de Yucatán se le conoce como Sikil-té, palabra maya y en totonaca como Chu'ta.

La *Jatropha* tiene tres variedades: una de Nicaragua, una mexicana (que se distingue por sus semillas con menos o nula toxicidad) y una de Cabo Verde (Heller, 1996). La *Jatropha* fue introducida después en África y Asia y ahora se cultiva en todo el mundo (Sujatha & Prabakaran, 1997). Las especies de *Jatropha* esencialmente se reproducen por polinización cruzada lo cual produce un alto grado de variación. Esta variación le ha permitido a *Jatropha* adaptarse a un vasto rango de condiciones edáficas y ecológicas (Rao *et al.*, 2008) y ofrece al mejorador un extenso rango de posibilidades para llevar

a cabo una amplia selección de semillas con los atributos deseados (Ginwall *et al.*, 2005). La variabilidad de *Jatropha* también se refleja en la diversidad en el contenido de aceite de las semillas (Kaushik *et al.*, 2007), en el rendimiento; en el tamaño, peso y forma de la semilla (Kaushik *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2008), así como en el tiempo de floración (Sunil *et al.*, 2009) y en la relación del número de flores femeninas y masculinas (Rao *et al.*, 2008).

Extremos ambientales

Los diferentes extremos ambientales son uno de los factores limitantes que afectan adversamente el crecimiento y el desarrollo de las plantas, especialmente a las especies vegetales del trópico y del subtrópico. Se sabe que los mecanismos que contienen con los extremos ambientales son complejos y multigénicos (Hughes & Dunn, 1996; Thomashow, 1998; Thomashow, 1999). De los diferentes procesos fisiológicos, la fotosíntesis es usualmente uno de los más sensibles a los extremos ambientales.

Mientras que *J. curcas* puede resistir heladas ligeras (1,700 m de altitud), es relativamente sensible a bajas temperaturas (Heller, 1996; Luo *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2006). El daño debido a bajas temperaturas puede producir una drástica disminución en el contenido de clorofila y de los ácidos grasos insaturados de la membrana de *J. curcas* y en la sobrevivencia de las semillas (Luo *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2006). Las proteínas involucradas en la fotosíntesis y las

funciones del fotosistema II de plántulas de *J. curcas* son relativamente sensibles a las bajas temperaturas, especialmente durante las primeras 12 horas del congelamiento (Liang *et al.*, 2007). La fluorescencia de la clorofila indica la presencia de un mecanismo de protección a la fotoinhibición en estadios tempranos del congelamiento. Se ha determinado que ocho proteínas relacionadas con la fotosíntesis cambian significativamente durante el congelamiento (Liang *et al.*, 2007).

Kumar *et al.*, (2008) han determinado que la exposición a la sal de callos de *J. curcas*, disminuye su contenido de K, Ca y Mg y aumenta el de Na, así como el de algunas enzimas involucradas en el metabolismo de los radicales libres.

BIOTECNOLOGÍA

Varias de las biotecnologías existentes pueden emplearse para mejorar la producción de bioenergía, por ejemplo, en el desarrollo de materia prima para la producción de biomasa y para mejorar la conversión de biomasa en biocombustible (Wiebe *et al.*, 2008). Las variedades de plantas que se usan actualmente para la primera generación de biocombustibles han sido seleccionadas por sus características relevantes para la producción de alimentos y/o alimento para ganado y no por características que favorezcan su uso como materia prima para la producción de biocombustibles.

La biotecnología puede ayudar a acelerar la selección de variedades que sean más apropiadas para la producción de

biocombustibles –con un aumento en la producción de biomasa por hectárea, aumento en el contenido de aceites o de azúcares fermentables, o que mejoren las características de procesamiento que faciliten su conversión a biocombustibles-. Los campos de la genómica, proteómica y metabolómica jugarán una creciente e importante función en ello. La secuencia de genomas de diversas especies que pueden ser utilizadas como materia prima de primera generación, tales como maíz, sorgo y soya, ya han sido terminados o están a punto de ser terminados². Además de las “omics”, se pueden aplicar otras biotecnologías como la selección asistida por marcadores y la modificación genética.

Jatropha se propaga a escala masiva por siembra directa de las semillas o por esquejes (Li *et al.*, 2008b), sin embargo, el bajo rendimiento de semilla y la facilidad con que se sacan las plantas de los suelos pobres y marginales impiden la utilidad práctica de estos métodos de propagación. Además, se requiere del uso de métodos biotecnológicos para introducir rasgos deseables en las diferentes especies de *Jatropha*. Actualmente se han reportado protocolos de cultivo de tejidos para el cultivo de endospermo y la propagación rápida de genotipos selectos de *Jatropha* (Deore & Johnson, 2008; He *et al.*, 2009; Jha *et al.*, 2007; Khurana-Kaul *et al.*, 2010; Kochhar *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2011; Misra *et al.*, 2010; Purkayastha *et al.*, 2010;

Rajore & Batra, 2005; Sujatha *et al.*, 2000; 2005; Sujatha & Dhingra, 1993; Sujatha & Mukta, 1996; Varshney & Johnson, 2010; Weida *et al.*, 2003).

También se han reportado diversos protocolos para la regeneración de plantas de *J. integerrima* (Sujatha & Dhingra, 1993). Sujatha *et al.* (2005) desarrollaron un método para la diferenciación de brotes adventicios combinados con callos a partir de explantes vegetativos de *J. curcas* no tóxica. Weida *et al.* (2003) reportaron la inducción de brotes a partir de callos de *J. curcas*. A pesar de que se han reportado diferentes sistemas de regeneración a partir de explantes de hoja, la presencia de callos no es deseable para la producción de plantas (Deore & Johnson, 2008). En nuestro laboratorio hemos desarrollado todos los protocolos de cultivo de tejido para *Jatropha*, con el fin de utilizarlos en técnicas de transformación (Fig. 3).

La calidad de las plantas de *J. curcas* obtenidas por técnicas de cultivo de tejidos vegetales no muestra diferencias con plantas obtenidas por técnicas tradicionales (Sujatha & Dhingra, 1993). Sin embargo, en un reporte reciente se demostró que las plantas propagadas clonalmente (cutting-raised) se comportan mejor en el campo que las producidas a partir de semilla (Kochhar *et al.*, 2008).

Ingenierías genética y metabólica

Si bien es posible utilizar técnicas de mejoramiento convencional para

² http://genomevolution.org/wiki/index.php/Sequenced_plant_genomes

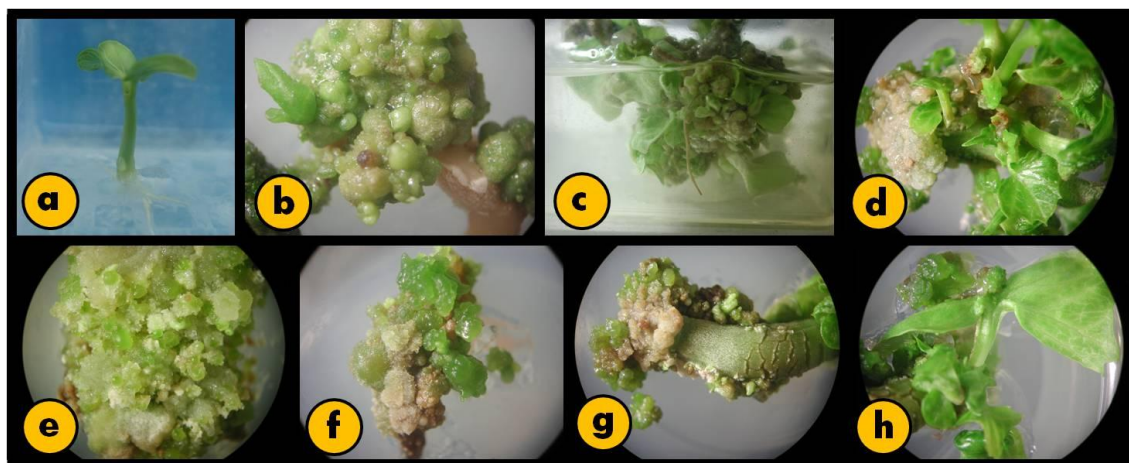


Fig. 3. a) Planta de *J. curcas* de 8 días en cultivo *in vitro*, b) y c) embriones somáticos a partir de raíces de plántulas en hidroponia de 60 días en cultivo; d) brotes a partir de hipocotilo de 90 días en cultivo; e) embriones en estadio globular presentes en callo de hipocotilo de 180 días en cultivo; f) embriones obtenidos a partir de hoja de 60 días en cultivo; g) embriones a partir de hipocotilo después de 120 días en cultivo; h) plantas obtenidas a partir de embriones somáticos. Los cultivos en b, c y f están en medio de Murashige y Skoog (1962) con 13.3 μM de BA + 17.1 μM de AIA, los cultivos d, e, g, f y h están en medio Murashige y Skoog (1962) con 2.22 μM de BA + 0.49 μM de IBA.

seleccionar líneas que podrían tener rasgos agronómicos mejorados, dicho proceso consume tiempo y requiere de una mano de obra intensiva (Murphy, 2006; Scarth & Tang, 2006). El advenimiento de la ingeniería genética trajo consigo nuevas estrategias para el mejoramiento genético de las plantas, permitiendo la introducción directa de genes que codifican para el atributo de interés (Klee *et al.*, 1987). Este hecho no solo permite una incorporación más precisa de la información genética en la planta blanco (comparado con la transferencia variable y sin control que se lleva a cabo durante la recombinación sexual), pero también evade la necesidad de compatibilidad sexual entre las líneas parentales (Murphy, 2006). Así es posible modificar genéticamente a una planta con

genes provenientes de cualquier organismo, no sólo con los genes relacionados a la especie (Klee *et al.*, 1987).

Así, el potencial de introducir rasgos novedosos en cultivos de plantas superiores ha permitido a los investigadores considerar el concepto de semilla de aceite diseñada, a la cual se le han añadido características no presentes en los cultivos actuales (tales como soya, maíz, brásica, etc.) (Murphy, 1994; Thelen & Ohlrogge, 2002). Tales semillas podrían contener ácidos grasos que sean útiles en procesos industriales, ya sea como lubricantes o como materia prima para otros usos (Jaworsky & Cahoon, 2003; Singh *et al.*, 2005). Por ejemplo, LS9, Inc. (Renewable Petroleum Company™), es

una compañía biotecnológica en el sur de San Francisco que ha desarrollado biocombustibles con base en el poder de la biología sintética. Los científicos de esta compañía están trabajando para transformar los ácidos grasos naturales producidos por *E. coli* en combustibles hidrocarbonados específicos.

La transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* se ha convertido en el método más usado en la investigación de plantas, así como la principal tecnología para la generación de plantas transgénicas (Miki & McHugh, 2004; Von Wettstein, 2007). Para aplicar este método a *J. curcas*, un prerrequisito es el establecimiento de un sistema eficiente de regeneración. Recientemente, se han publicado varios protocolos para la transformación de *J. curcas* (Kumar *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2008b; Li *et al.*, 2006; Purkayastha *et al.*, 2010). Si bien no en todos se han regenerado plantas transgénicas.

La transformación de *J. curcas* se ha llevado a cabo con *A. tumefaciens* (Kumar *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2008b) y con bombardeo con partículas recubiertas con el plásmido pBI426 conteniendo una fusión de GUS-NPT II bajo el control de un promotor doble 35S (Purkayastha *et al.*, 2010). Se han transformado diferentes tejidos como hoja (Kumar *et al.*, 2010), meristemos apicales (Purkayastha *et al.*, 2010) y cotiledones (Li *et al.*, 2008b). Se ha determinado que *J. curcas* es insensible a la cefotaxima, mientras que es sensible a la kanamicina, higromicina y a la

fospinotricina, antibióticos empleados para la eliminación de la bacteria después del evento de transformación. Los tres últimos antibióticos suprimen la morfogénesis (Li *et al.*, 2006). Esta sensibilidad a la higromicina fue utilizada por Kumar *et al.*, (2010) para seleccionar brotes transgénicos a los que se les ha introducido el gene de la higromicina-fosfotransferasa; en este caso la eficiencia de la transformación alcanzó el 29% (Kumar *et al.*, 2010).

Estos esfuerzos han sido llevados a cabo para establecer las condiciones de la transformación y en algunos casos de la regeneración de los brotes regenerados. En ninguno de los casos se han introducidos genes para mejorar a la planta, ya sea en términos fisiológicos o en relación con la biosíntesis de sus triacilglicéridos.

ACEITES VEGETALES COMO FUENTE PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL

Los aceites vegetales están constituidos principalmente por triglicéridos (triésteres), que son moléculas resultantes de la esterificación de la glicerina o glicerol (trialcohol) con tres moléculas de ácido graso (Hildebrand, 2011). En principio, cualquier fuente renovable de triglicéridos es materia prima óptima para la producción de biodiésel. La industria del biodiésel en el ámbito mundial nació con el aceite de colza, posteriormente los aceites de mayor producción y demanda en el mercado alimentario han sido los aceites de girasol, soya y palma aceitera. Sin embargo, para

la producción de biodiésel se requiere que no exista conflicto entre la producción de alimentos y la producción de aceite para la producción de biodiésel.

El biodiesel es el biocombustible de máximo crecimiento en el mercado durante los últimos años (Tao & Aden, 2009). Para su obtención se utilizan semillas de plantas oleaginosas como la soya, el sorgo o el girasol o grasa animal. Posteriormente este aceite se hace reaccionar con un alcohol (generalmente metanol, en un proceso denominado esterificación) en presencia de un catalizador para producir el biodiésel. Este proceso produce metil ésteres y como subproducto glicerina (Gerpen, 2010; Sastre *et al.*, 2008).

Aceite de Jatropha curcas.

Dada las desventajas que presenta el uso de cultivos de uso alimentario para la obtención de biodiésel, una alternativa viable es el cultivo de *J. curcas*, una

oleaginosa que presenta características favorables para la producción de biodiésel entre otras, las características fisicoquímicas del aceite de su semilla y su contenido de aceite, así como algunas características agronómicas de la planta, la hacen una buena fuente alterna para la producción de energía renovable (Heller, 1996; Parawira, 2010).

Jatropha no es la planta con el mayor contenido de aceite en sus semillas, ni tampoco la planta con los mejores rendimientos en la producción de aceite y biodiésel por hectárea (Tabla 1) (Winayanuwattikun *et al.*, 2008). Sin embargo, cuando se toman en cuenta parámetros como la comestibilidad de la planta, sus requerimientos nutricionales para crecer, etc. Al final se tiene una planta con una serie de cualidades que la hace un buen candidato para la producción de aceite para obtener biodiésel.

Tabla 1. Rendimiento promedio en la producción de aceite y biodiésel por hectárea. Recalculado de Winayanuwattikun *et al.* (2008) con permiso.

Especie	Rendimiento de aceite (%, p/p)	Rendimiento de aceite (kg ha ⁻¹)	Rendimiento biodiésel (kg ha ⁻¹)
Palma aceitera	ND	10,504	13,338
Oliva	ND	7,039	5,631
Piñon	43.8	2,163	1,731
Sésamo	63.8	1,606	1,285
Almedro	62.9	1,553	1,242

El género *Jatropha* contiene una amplia gama de compuestos, entre los más importantes se encuentran: los ésteres de forbol, que provocan el efecto purgante (Jongschaap *et al.*, 2007) sapogeninas,

lactonas, triterpenos, taninos, ésteres, toxoalbúminas, compuestos cianogénicos y además, contiene aceites y ácidos grasos como palmítico, oleico, linoleico, esteárico, etc. El aceite de *Jatropha* es de color

amarillo claro, inoloro y con sabor ligero a nuez. La composición del aceite contenido en sus semillas varía entre 20 y 60% dependiendo de la fuente consultada. Es de especial interés el hecho de que el contenido de los ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico varía entre 17.8 y 25.1%, en tanto que el contenido de los ácidos grasos insaturados, palmitoleico, oleico y linoleico varía entre 51.8 y 96.7%

(Tabla 2). El contenido de ácidos grasos insaturados es un blanco para el trabajo biotecnológico, ya que a mayor contenido de éstos, menor el valor del índice de cetano, parámetro que mide la capacidad de ignición del biodiésel. Es deseable que los ácidos grasos insaturados sean convertidos en ácidos grasos saturados para mejorar la calidad del biodiésel obtenido.

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos en el aceite de las semillas de *Jatropha curcas* reportado por diferentes grupos.

Ácido graso	¹ (%)	² (%)	³ (%)	⁴ (%)
Laúrico (12:0)	5.9			
Mirístico (14:0)	2.7	0.38		0-0.1
Palmítico (16:0)	13.5	16	18.22	14.1-15.3
Estéarico (18:0)	6.1	6-7	5.14	3.7-9.8
Oleico (18:1)	21.8	42-43.5	28.46	34.3-45.8
Linoleico (18:2)	47.4	33-34.4	48.18	29.0-44.2
Otros	2.7			
Palmitoleico (16:1)		1-3.5		0-1.3
Linolénico (18:3)		>0.8		0-0.3
Araquídico (20:0)		0.2		0-0.3
Gadoleico		0.12		
Behenico				0-0.2

¹(de Oliveira *et al.*, 2009); ²(Om Tapanes *et al.*, 2008); ³(Hawash *et al.*, 2009); ⁴(Gübitz *et al.*, 1999).

BIOSÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN *J. curcas*.

La biosíntesis de los ácidos grasos es un proceso complejo, e involucra la participación de diferentes organelos de la

célula. En el caso de *J. curcas* apenas se está iniciando el estudio de esta ruta metabólica. A la fecha se ha aislado el ADNc que codifica para la β -cetoacil-ACP sintasa III (KAS III; EC, 2.3.1.180) (Li *et al.*,

2008a). El ADNc clonado (denominado JcKAS III) contiene un marco de lectura que codifica para 400 aminoácidos con una masa molecular predicha de cerca de 42 kDa. La secuencia de aminoácidos deducida comparte 80% de identidad con la KAS III de otras especies vegetales y contiene una cisteína conservada en el sitio activo y el motivo G355NTSAAS361, el cual es responsable para la regulación del pegado de los acil-ACPs. Un análisis tipo Southern sugiere que JcKAS III se encuentra como copia única en el genoma de *J. curcas*. Un análisis de PCR de *tiempo real* muestra que JcKAS III se expresa en todos los tejidos examinados con una mayor expresión en las raíces y su expresión aumenta conforme se desarrolla la semilla (Li *et al.*, 2008a).

Otro de los genes estudiados en *J. curcas* corresponde a la estearoil-acil desaturasa (SAD; EC, 1.14.19.1). Este gen se obtuvo mediante técnicas de RT-PCR y RACE a partir de semillas en desarrollo de *J. curcas*. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida muestra que tiene una elevada similitud con otras estearoil-ACP desaturasas. El gen fue clonado y expresado en *Escherichia coli* y la actividad de la proteína recombinante se midió utilizando ferredoxina de espinaca. El análisis tipo Southern muestra que este gen es miembro de una pequeña familia. Los análisis tipo Northern revelaron que este gen se expresa de manera preponderante en frutos en desarrollo de *J. curcas* (Tong *et al.*, 2006).

Usando la misma técnica se clonó un fragmento de un ADNc de 1491 pb de una estearoil-ACP desaturasa a partir de semillas en desarrollo de *J. curcas*. El fragmento contiene un marco de lectura completo de 1191 pb (JcSAD). Su análisis muestra que codifica para una proteína con un péptido señal de 33 aminoácidos y un péptido de 363 aminoácidos. El análisis de su secuencia muestra que posee una elevada homología, tanto para la secuencia nucleotídica como para la secuencia de aminoácidos, con otras SADs de plantas. La identidad nucleotídica y peptídica de JSAD con las de *Ricinus communis* SAD (RsAD) es de 89 y 96.2% respectivamente. El modelaje molecular de JcSAD indica que su estructura tridimensional re-ensambla fuertemente la estructura cristalina de la RsAD (Luo *et al.*, 2007).

Recientemente Xu *et al.*, (2011) determinaron los perfiles de expresión temporal de 21 genes que participan en la biosíntesis de los triacilglicéridos. De los genes estudiados, 17 de ellos aumentan su expresión en semillas en desarrollo cuando su expresión se compara con la de la hoja.

En suma, se han estudiado algunos de los genes que codifican para las enzimas involucradas en la biosíntesis de los triacilglicéridos en *J. curcas*. Sin embargo, no hay un estudio sistemático de todo el proceso, y que incluya la medida de las actividades enzimáticas. Este es un campo de la investigación en *J. curcas* que requiere de atención inmediata.

CONCLUSIONES

En la actualidad las sociedades alrededor del mundo se encuentran inmersas en el trilema: conservación del medio ambiente, alimentos y biocombustibles (Buyx & Tait, 2011; Rosset, 2009; Tilman *et al.*, 2009). Los biocombustibles deben considerarse dentro del contexto del precio mundial para los alimentos, la crisis alimentaria en la que se encuentran inmersos diversos países y la compatibilidad con la soberanía alimentaria de las naciones (Rosset, 2009). Sin embargo, también es cierto que existen soluciones a la mano para resolverlo.

El mejoramiento genético de *J. curcas* está a la cabeza de estas posibles soluciones. El mejoramiento de la resistencia a enfermedades y extremos ambientales es la principal prioridad para hacer que esta planta un modelo exitoso para la producción de biocombustibles. Otra posibilidad de mejora es la manipulación de la ruta de biosíntesis de los ácidos grasos que forman los triacilglicéridos. Se puede modificar el perfil de los ácidos grasos producidos por las semillas, así como la cantidad que almacenan. También se puede manipular a la planta, mediante técnicas biotecnológicas, para que *J. curcas* pueda ser cultivada en terrenos que no tienen vocación agrícola. De esta forma, grandes áreas de terreno que se encuentran sin utilizar pueden ser utilizadas para su cultivo.

No hay una solución única al problema de la sustitución de combustibles fósiles.

Existe la posibilidad de utilizar otras plantas, como los agaves, para la producción de biocombustibles (Davis *et al.*, 2011). La planta que se escoja dependerá en gran medida de la zona agroecológica de la que se trate, así como de los factores sociales y económicos involucrados.

Algunos sectores están en mejor posición que otros para solucionar su problema energético. Entre los diversos factores que se deben considerar, se encuentran la estructura de los costos del combustible en la cadena productiva, la disminución en las emisiones contaminantes de cada industria en particular, la relación costo-beneficio, entre otros (Whitfield, 2011). Por ejemplo, la industria del transporte aéreo está mejor posesionada que la industria del transporte terrestre. Todos estos factores deberán tomarse en cuenta antes de tomar una decisión sobre el uso de biocombustibles.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo del laboratorio de los autores ha tenido el financiamiento parcial de la BioRed (Conacyt).

REFERENCIAS

- Abou Kheira AA & Atta NMM (2009)
Response of *Jatropha curcas* L. to water deficit: yield, water use efficiency and oilseed characteristics. *Biomass Bioenerg.* 33: 1343-1350.
- Adebowale KO & Adedire CO (2006)
Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha*

- curcas* seed oil. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 901-906.
- Annarao S, Sidhu OP, Roy R, Tuli R & Khetrapal CL (2008) Lipid profiling of developing *Jatropha curcas* L. seeds using ^1H NMR spectroscopy. *Biores. Technol.* 99: 9032-9035.
- Banerji R, Chowdhury AR, Misra G, Sudarsanan G, Verma SC & Srivastava GS (1985) *Jatropha* seed oils for energy. *Biomass.* 8: 277-282.
- Beyra A, Leon MadC, Iglesias E, Ferraándiz D, Herrera R, Volpato G, Godínez D, Álvarez R & Guimaris M (2005) Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camaguey (Cuba). *Anal. Jard. Bot. Madrid.* 61: 185-204.
- Buyx A & Tait J (2011) Ethical framework for biofuels. *Science.* 332: 540-541.
- Chang DYZ, Van Gerpen JH, Lee I, Jonson IA, Hammond EG & Marley SJ (1996) Fuel properties and emissions of soybean oil esters as diesel fuel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 1549-1555.
- Chen Y-X, Mao Z-Q, Wu Z-B, Zhu H-P & Tang Z-Y (2006) Comprehensive exploitation and utilization of *Jatropha* oil plants. *China Oils Fats.* 31: 63-65.
- Davis SC, Dohleman FG & Long SP (2011) The global potential for Agave as a biofuel feedstock. *GCB Bioenergy.* 3: 68-78.
- de Oliveira JS, Leite PM, de Souza LB, Mello VM, Silva EC, Rubim JC, Meneghetti SMP & Suarez PAZ (2009) Characteristics and composition of *Jatropha gossypifolia* and *Jatropha curcas* L. oils and application for biodiesel production. *Biomass Bioenerg.* 33: 449-453.
- Deore A & Johnson T (2008) High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnol. Rep.* 2: 7-11.
- Diesel R, (1913) Die Entstehung des Dieselmotors. Verlag von Julius Springer, Berlin.
- Forson FK, Oduro EK & Hammond-Donkoh E (2004) Performance of *Jatropha* oil blends in a diesel engine. *Renew. Ener.* 29: 1135-1145.
- Francis G, Edinger R & Becker K (2005) A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. *Nat. Res. Forum.* 29: 12-24.
- Ganesh Ram S, Parthiban K, Senthil Kumar R, Thiruvengadam V & Paramathma M (2008) Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 55: 803-809.
- Gerbens-Leenes W, Hoekstra AY & van der Meer TH (2009) The water footprint of bioenergy. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* 106: 10219-10223.
- Gerpen JV (2010) Biodiesel: small scale production and quality requirements. *Meth. Mol. Biol.* 581: 281-290.
- Ginwall HS, Phartyal SS, Rawat PS & Srivastava RL (2005) Seed source variation in morphology, germination and seedling growth of *Jatropha curcas*

- Linn., in Central India. *Silvae Genet.* 54: 76-80.
- González-Pinacho JA (2009) Determinación de enfermedades fungosas asociadas al piñón (*Jatropha* spp.) en la Depresión Central de Chiapas. UACH, Villaflores, Chiapas.
- Gübitz GM, Mittelbach M & Trabi M (1999) Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Biores. Technol.* 67: 73-82.
- Hawash S, Kamal N, Zaher F, Kenawi O & Diwani GE (2009) Biodiesel fuel from *Jatropha* oil via non-catalytic supercritical methanol transesterification. *Fuel.* 88: 579-582.
- He Y, Guo X, Lu R, Niu B, Pasapula V, Hou P, Cai F, Xu Y & Chen F (2009) Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 98: 11-17.
- Heller J (1996) Physic Nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Hildebrand D (2011) Lipid biosynthesis. In: Plant metabolism and biochemistry, Ashihara H Crozier A & Komamine A (eds). John Wiley & Sons, Ltd., Great Britain. pp. 27-65.
- Hughes MA & Dunn MA (1996) The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J. Exp. Bot.* 47: 291-305.
- Jaworsky J & Cahoon EB (2003) Industrial oils from transgenic plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 178-184.
- Jha T, Mukherjee P & Datta M (2007) Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotechnol. Rep.* 1: 135-140.
- Jongschaap REE, Corré WJ, Bindraban PS and Brandenburg WA (2007) Claims and facts on *Jatropha curcas* L.: global *Jatropha curcas* evaluation, breeding and propagation programme. Report 158. Plant Research International, Wageningen, Netherlands.
- Kalbande S, More G & Nadre R (2008) Biodiesel production from non-edible oils of *Jatropha* and *Karanj* for utilization in electrical generator. *Bioener. Res.* 1: 170-178.
- Karmee SK, Mahesh P, Ravi P & Chadha A (2004) Kinetics study of the base catalyzed transesterification of monoglycerides from *pongamia* oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81: 425-430.
- Kaushik N, Kumar K, Kumar S, Kaushik N & Roy S (2007) Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) accessions. *Biomass Bioenerg.* 31: 497-502.
- Khurana-Kaul V, Kachhwaha S & Kothari S (2010) Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in the medium. *Biol. Plant.* 54: 369-372.
- Klee H, Horsch R & Rogers S (1987) *Agrobacterium*-mediated plant

- transformation and its further applications to plant biology. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38: 467-486.
- Knothe G (2005) The history of vegetable oil-based diesel fuels. *In: The biodiesel handbook*, Knothe G van Gerpen J & Krahl J (eds). AOCS Press, Champaign, Illinois. pp. 4-15.
- Kochhar S, Singh SP & Kochhar VK (2008) Effect of auxins and associated biochemical changes during clonal propagation of the biofuel plant--*Jatropha curcas*. *Biomass Bioenerg.* 32: 1136-1142.
- Kumar N, Pamidimarri S, Kaur M, Boricha G & Reddy M (2008) Effects of NaCl on growth, ion accumulation, protein, proline contents and antioxidant enzymes activity in callus cultures of *Jatropha curcas*. *Biologia.* 63: 378-382.
- Kumar N, Vijay Anand KG, Sudheer Pamidimarri DVN, Sarkar T, Reddy MP, Radhakrishnan T, Kaul T, Reddy MK & Sopori SK (2010) Stable genetic transformation of *Jatropha curcas* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using leaf explants. *Ind. Crop Prod.* 32: 41-47.
- Kumar N, Vijay Anand KG & Reddy MP (2011) *In vitro* regeneration from petiole explants of non-toxic *Jatropha curcas*. *Ind. Crop Prod.* 33: 146-151.
- Li J, Li M-R, Wu P-Z, Tian C-E, Jiang H-W & Wu G-J (2008a) Molecular cloning and expression analysis of a gene encoding a putative β -ketoacyl-acyl carrier protein (ACP) synthase III (KAS III) from *Jatropha curcas*, *Tree Physiol.* 28: 921-927.
- Li M, Li H, Jiang H, Pan X & Wu G (2008b) Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 92: 173-181.
- Li MR, Li HQ & Wu GJ (2006) Study on factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of *Jatropha curcas*. *J. Mol. Cell Biol.* 39: 83-87.
- Liang Y, Chen H, Tang M-J, Yang P-F & Shen S-H (2007) Responses of *Jatropha curcas* seedlings to cold stress: photosynthesis-related proteins and chlorophyll fluorescence characteristics. *Physiol. Plant.* 131: 508-517.
- Luo T, Deng W-Y & Chen F (2006) Study on cold-resistance ability of *Jatropha curcas* growing in different ecological environments. *Acta Sci. Nat. Univ. Nei Mongol.* 37: 446-449.
- Luo T, Ma Dw, Xu Y, Deng WY, Xiao M, Qing Rw & Chen F (2007) Cloning and characterization of a stearyl-ACP desaturase gene from *Jatropha curcas*. *J. Shanghai Univ. (Eng. Ed.)*. 11: 182-188.
- Maes WH, Achten WMJ & Muys B (2009) Use of inadequate data and methodological errors lead to an overestimation of the water footprint of *Jatropha curcas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 106: E91.
- Mampane KJ, Joubert PH & Hay IT (1987) *Jatropha curcas*: use as a traditional Tswana medicine and its role as a cause

- of acute poisoning. *Phytoth. Res.* 1: 50-51.
- Miki B & McHugh S (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J. Biotechnol.* 107: 193-232.
- Misra P, Gupta N, Toppo D, Pandey V, Mishra M & Tuli R (2010) Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 100: 189-197.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Murphy DJ (1994) Manipulation of lipid metabolism in transgenic plants: Biotechnological goals and biochemical realities. *Biochem. Soc. Trans.* 22: 926-931.
- Murphy DJ (2006) Molecular breeding strategies for the modification of lipid composition. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant.* 42: 89-99.
- Ogbobe O & Akano V (1993) The physico-chemical properties of the seed and seed oil of *Jatropha gossipifolia*. *Plant Food. Hum. Nutr.* 43: 197-200.
- Om Tapanes NC, Gomes Aranda DA, de Mesquita Carneiro JW & Ceva Antunes OA (2008) Transesterification of *Jatropha curcas* oil glycerides: Theoretical and experimental studies of biodiesel reaction. *Fuel.* 87: 2286-2295.
- Openshaw K (2000) A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass Bioenerg.* 19: 1-15.
- Parawira W (2010) Biodiesel production from *Jatropha curcas*: A review. *Sci. Res. Essays.* 5: 1796-1808.
- Purkayastha J, Sugla T, Paul A, Solleti S, Mazumdar P, Basu A, Mohommad A, Ahmed Z & Sahoo L (2010) Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. *Biol. Plant.* 54: 13-20.
- Rajagopal R (2008) Best practices for long-term *Jatropha* development. KnowGenix, Mumbai, India.
- Rajore S & Batra A (2005) Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. *J. Plant Biochem. Biot.* 14: 73-75.
- Rao G, Korwar G, Shanker A & Ramakrishna Y (2008) Genetic associations, variability and diversity in seed characters, growth, reproductive phenology and yield in *Jatropha curcas* (L.) accessions. *Tress-Struct. Funct.* 22: 697-709.
- Robertson GP, Dale VH, Doering OC, Hamburg SP, Melillo JM, Wander MM, Parton WJ, Adler PR, Barney JN, Cruse RM, Duke CS, Fearnside PM, Follett RF, Gibbs HK, Goldemberg J, Mladenoff DJ, Ojima D, Palmer MW, Sharpley A, Wallace L, Weathers KC, Wiens JA & Wilhelm WW (2008) Sustainable biofuels redux. *Science.* 322: 49-50.
- Rodríguez-Acosta M, Vega-Flores K, De Gante-Cabrera VH & Jiménez-Ramírez J (2009) Distribución del género *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) en el

- estado de Puebla, México. *Polibotánica*. 28: 37-48.
- Rosset P (2009) Agrofuels, food sovereignty, and the contemporary food crisis. *B. Sci. Technol. Soc.* 29: 189-193.
- Sánchez-Medina A, García-Sosa K, May-Pat F & Peña-Rodríguez LM (2001) Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan Traditional Medicine Part I. Antioxidant, antimicrobial and b-glucosidase inhibition activities. *Phytomedicine*. 8: 144-151.
- Sastre S, Peguero G, Lomas P & Di Donato M (2008) Crítica y perspectivas de los AGRO (bio) combustibles: el caso de Cataluña en el contexto español. *In: AGRO (bio) combustible Por qué no nos salvarán*, Di DM (ed). Madrid. pp. 29-46.
- Scarth R & Tang J (2006) Modification of Brassica oil using conventional and transgenic approaches. *Crop Sci.* 46: 1225-1236.
- Schmeda-Hirschmann G, Razmilic I, Sauvain M, Moretti C, Muñoz V, Ruiz E, Balanza E & Fournet A (1996) Antiprotozoal activity of jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and jatrophone from *Jatropha isabellii*. *Phytoth. Res.* 10: 375-378.
- Scott P, Pregelj L, Chen N, Hadler J, Djordjevic M & Gresshoff P (2008) *Pongamia pinnata*: An untapped resource for the biofuels industry of the future. *Bioener. Res.* 1: 2-11.
- Singh S, Zhou XR, Liu Q, Szymne S & Green AG (2005) Metabolic engineering of new fatty acids in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 197-203.
- Songstad D, Lakshmanan P, Chen J, Gibbons W, Hughes S & Nelson R (2009) Historical perspective of biofuels: learning from the past to rediscover the future. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant.* 45: 189-192.
- Staubmann R, Ncube I, Gübitz GM, Steiner W & Read JS (1999) Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. seeds. *J. Biotechnol.* 75: 117-126.
- Sujatha M & Dhingra M (1993) Rapid plant regeneration from various explants of *Jatropha integerrima*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 35: 293-296.
- Sujatha M, Makkar HPS & Becker K (2005) Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Growth Regul.* 47: 83-90.
- Sujatha M & Mukta N (1996) Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44: 135-141.
- Sujatha M & Prabakaran AJ (1997) Characterization and utilization of Indian *Jatropha*. *Indian J. Plant Genet. Resour.* 10: 123-128.
- Sujatha M, Sivaraj N & Prasad MS (2000) Biochemical and histological changes during *in vitro* organogenesis in *Jatropha Integerrima*. *Biol. Plant.* 43: 167-171.
- Sunil N, Sivaraj N, Anitha K, Abraham B, Kumar V, Sudhir E, Vanaja M & Varaprasad K (2009) Analysis of diversity and distribution of *Jatropha curcas* L. germplasm using Geographic

- Information System (DIVA-GIS). *Genet. Resour. Crop Evol.* 56: 115-119.
- Tao L & Aden A (2009) The economics of current and future biofuels. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant.* 45: 199-217.
- Thelen JJ & Ohlrogge J (2002) Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. *Met. Eng.* 4: 12-21.
- Thomashow MF (1998) Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.* 118: 1-8.
- Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 571-599.
- Tilman D, Hill J & Lehman C (2006) Carbon-negative biofuels from low-input high-diversity grassland biomass. *Science.* 314: 1598-1600.
- Tilman D, Socolow R, Foley JA, Hill J, Larson E, Lynd L, Pacala S, Reilly J, Searchinger T, Somerville C & Williams R (2009) Beneficial biofuels--The food, energy, and environment trilemma. *Science.* 325: 270-271.
- Tong L, Shu-Ming P, Wu-Yuan D, Dan-Wei M, Ying X, Meng X & Fang C (2006) Characterization of a new stearyl-acyl carrier protein desaturase gene from *Jatropha curcas*. *Biotechnol. Lett.* 28: 657-662.
- Toral O, Iglesias JM, Montes de Oca S, Sotolongo JA, García S & and Torsti M (2008) *Jatropha curcas* L., una especie arbórea con potencial energético en Cuba. *Pastos y Forrajes.* 31: 191-207.
- Trebien HA, Neves PCA, Yunes RA & Calixto JB (1988) Evaluation of pharmacological activity of a crude hydroalcoholic extract from *Jatropha elliptica*. *Phytoth. Res.* 2: 115-118.
- Varshney A & Johnson T (2010) Efficient plant regeneration from immature embryo cultures of *Jatropha curcas*, a biodiesel plant. *Plant Biotechnol. Rep.* 4: 139-148.
- Von Wettstein D (2007) From analysis of mutants to genetic engineering. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 1-19.
- Wan Q, Huang Y, Xiao X-X, Li Y-S & Ding B (2006) The preliminary report on seed character and seedling growth of *Jatropha curcas* geographical provenances. *J. Fujian For Sci Technol.* 33: 13-16.
- Weida L, Qim W, Lin T, Fang Y & Fang C (2003) Induction of callus from *Jatropha curcas* and its rapid propagation. *Chinese J. Appl. Environ. Biol.* 9: 127-130.
- Whitfield R (2011) The biojetfuel industry: its rapid emergence, future development, and likely profile. *P. I. Mech. Eng. G-J. Aer.* 225: 619-630.
- Wiebe K, Croppenstedt A, Raney T, Skoet J, Zurek M, Tschirley J and Cluff M (2008) The state of food agriculture 2008. Biofuels: prospect, risks and opportunities. FAO, Rome.
- Winayanuwattikun P, Kaewpiboon C, Piriyanananon K, Tantong S, Thakernkarnkit W, Chulalaksananukul W & Yongvanich T (2008) Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed

Artículos

biodiesel production in Thailand.

Biomass Bioenerg. 32: 1279-1286.

Xu R, Wang R & Liu A (2011) Expression profiles of genes involved in fatty acid and triacylglycerol synthesis in

developing seeds of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.). *Biomass Bioenerg.* 35: 1683-1692.

Charcas Salineras: Ecosistemas Susceptibles de ser Usados para la Recuperación de Enzimas de Interés Industrial

Silvia Cabrera-López¹, Gustavo A. Rivera-Solís¹, José B. Escamilla-Sánchez¹,
Jorge A. Tamayo-Cortés¹, Sergio Ortiz-Milán², Sara E. Solís-Pereira¹ y
Gerardo Rivera-Muñoz^{1*}

¹*Instituto Tecnológico de Mérida*

Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica

Km. 5 Carr. Mérida-Progreso, S.N., Mérida, Yucatán, México, C.P. 97138

²*Industria Salinera de Yucatán, S.A. de C.V., Gerencia de Ecología*

Calle 1-H No. 105 Altos 17-A x 8 y 10, Col. México Norte,

Mérida, Yucatán, México, C.P. 97128

albatros1953@msn.com

RESUMEN

El Objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles de actividad enzimática asociadas a la degradación de la materia orgánica; proteasas, lipasas, celulasas y quitinasas presentes en el sistema de charcas salineras de Industria Salinera de Yucatán, S.A. de C.V. (ISYSA) ubicada en la comunidad de "Las Coloradas" estado de Yucatán. La charca más activa del sistema fue la denominada "Soledad" ya que presentó buenos niveles de las cuatro actividades enzimáticas evaluadas siendo la actividad quitinolítica la más importante tanto en la columna de agua, 141.04 $\mu\text{mol NaGlu/ml}$, como en la zona de sedimentos, 271.88 $\mu\text{mol NaGlu/ml}$. La segunda actividad más importante resulto ser la celulolítica con 70.07 $\mu\text{mol Glu/ml}$, en la columna de agua y 102.85 $\mu\text{mol Glu/ml}$ en la zona de sedimentos. En esta charca la salinidad expresada en % de NaCl fue del 26.3 % por lo que tanto los microorganismo como las enzimas presentes en la misma pueden ser catalogadas como halófilas extremas. Estos datos dejan entrever que eventualmente en los sistemas de charcas salineras de la empresa ISYSA podrían recuperarse, además del cloruro de sodio, extremozimas halófilas de interés industrial que están siendo producidas de manera simultánea al proceso de clarificación de las salmueras.

Palabras clave: *Charcas salineras, enzimas halófilas, quitinasas, proteasas, celulasas, lipasas*

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the levels of enzymatic activities associated with degradation of organic matter; proteases, lipases, cellulases and chitinases present in the system of solar saltworks of Industria Salinera de Yucatán, S.A. de C.V. (ISYSA), located in the community of "Las Coloradas" State of Yucatán. The most active pond of the system was "Soledad" since

presented good levels of the four enzymatic activities evaluated. Chitinolytic activity was the most important found in both, the water column, 141.04 $\mu\text{mol NaGlu/ml}$, as in the area of sediments, 271.88 $\mu\text{mol NaGlu/ml}$. The second most important was the cellulolytic activity with 70.07 $\mu\text{mol Glu/ml}$ in the water column and 102.85 $\mu\text{mol Glu/ml}$ in the zone of sediments. The salinity of this pond, expressed in % of NaCl, was 26.3%, for this reason the microorganism and the enzymes present can be classified as extreme halophilic. The current study shows that eventually we can recover the halophilic extremozymes produced during the clarification process of brines in the solar saltworks

Key Words: *Solar Saltworks, halophilic enzymes, chitinases, proteases, cellulases, lipases*

INTRODUCCIÓN

La empresa Industria Salinera de Yucatán S.A. de C.V. (ISYSA), está dedicada a la producción de sal en el mismo lugar, "Las coloradas", en donde la civilización maya cosechaba el mineral hace al menos 2100 años. Actualmente ISYSA comercializa 500,000 toneladas al año de cloruro de sodio de alta pureza en 21 estados de la república mexicana, Centroamérica, El Caribe y los Estados Unidos. El cloruro de sodio producido por ISYSA es sal de mar obtenida por evaporación solar, misma que después se somete a procesos industriales tecnificados en la planta refinadora ubicada en Tizimin, Yucatán (www.isysa.com.mx).

Obtener la sal de mar pudiera parecer un proceso simple y rápido en el que se requiere tan solo evaporar el agua de mar y cosechar

el producto. Sin embargo el producto obtenido mediante esta opción resulta ser amargo ya que es una mezcla de sales tales como KCl, MgCl_2 , CaSO_4 , CaCO_3 , MgSO_4 y el NaCl que representa el 80% del peso total.

Los sistemas de charcas salineras multipozas, son ecosistemas en los que se pueden visualizar dos zonas de evaporación, el área de concentración primaria y el área de cristalizadores, (Fig. 1). En ellos la zona de evaporación esta integrada por charcas de poca profundidad interconectadas de forma secuencial que son alimentadas con agua de mar, en las que el agua de mar se evapora haciendo uso de la energía solar y se va concentrando paulatinamente dando como resultado salmueras con valores de salinidad creciente.

Artículos

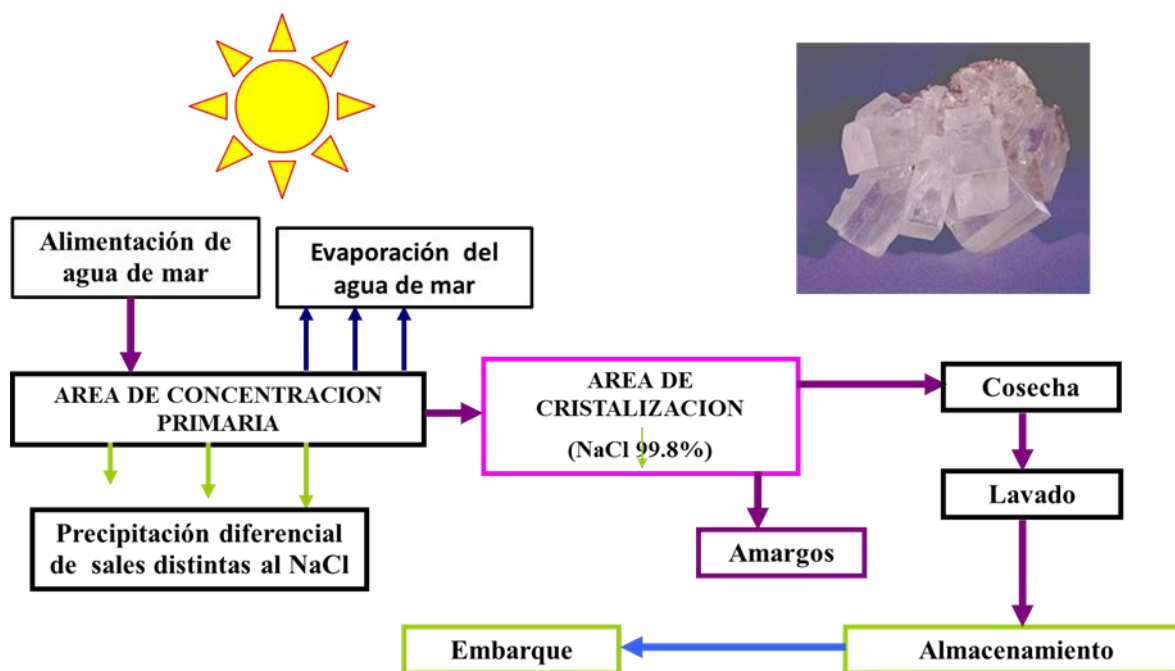


Fig. 1. Estructura general de los sistemas de charcas salineras

Durante este proceso se desarrollan de manera simultánea eventos fisicoquímicos y biológicos que permiten obtener cristales de cloruro de sodio con el 99.8% de pureza, libre de partículas insolubles (Davis & Giordano, 1996).

En los eventos fisicoquímicos se logra la precipitación diferencial de las sales que se encuentran disueltas junto con el cloruro de sodio en el agua de mar, para ello después de que se logra la precipitación de una de las sales, la salmuera resultante es trasladada a otra charca de la salina en donde la salinidad de la salmuera se incrementa hasta llegar al punto en la que otra de las sales precipita. Este evento se repetirá hasta que

el NaCl este prácticamente puro y se logre su precipitación en forma de cristales grandes en las pozas del área de cristalizadores.

El incremento de la salinidad favorece un incremento de la presión osmótica y un decremento de la actividad de agua (A_w) eventos que provocan la muerte de aquellos organismos que no sean capaces de adaptarse a estas condiciones y solo sobreviven algunos microorganismo (Fig. 2), como la microalga *Dunaliella salina*, capaces de sintetizar metabolitos intracelulares que funcionan como osmorreguladores, como el glicerol, arabitol, manitol, betainas y ácido glutámico (Grant, 2004).

Artículos

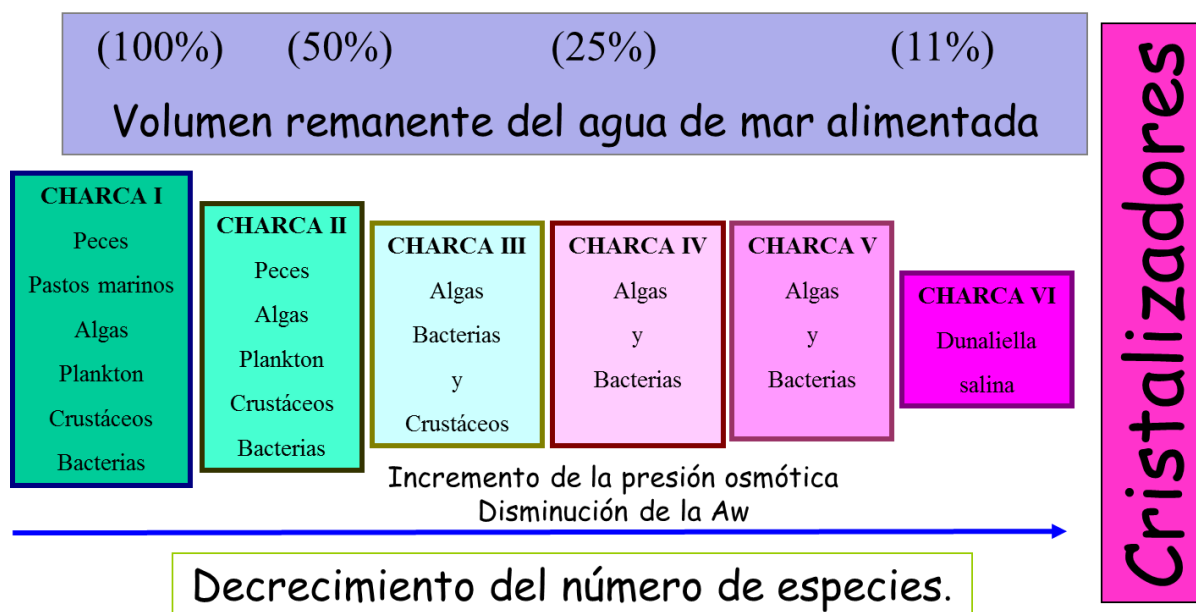


Fig. 2. Disminución de especies ante el incremento de la salinidad

Los procesos biológicos sirven para eliminar el detritus que se acumulan a lo largo del sistema, producto de la muerte de los organismos que no soportan las elevadas presiones osmóticas y las bajas actividades de agua y que son ricos en materia orgánica. Estos eventos los realizan principalmente microorganismo que se encuentran en la columna de agua o en las películas microbianas que se forman en los fondos de las charcas, mediante la síntesis de enzimas extracelulares que participan en la degradación de la materia orgánica como la celulosa, aportada por pastos marinos macro y microalgas (Chung, 2009), la quitina, proteínas y lípidos aportados por peces, moluscos y crustáceos presentes en el agua de alimentación (Liaw & Mah, 1992; Hau-Heredia *et al.*, 2009; VijayAnand *et al.*, 2009; Shivanand & Jayaraman, 2009).

Para realizar este proceso los microorganismos halófilos presentes en la columna de agua y la zona de sedimentos de las pozas sintetizan enzimas extracelulares capaces de funcionar bajo condiciones de salinidad y pH en las que una gran mayoría de las proteínas precipitarían o se desnaturalizarían. Las enzimas halófilas son capaces de mantenerse solvatadas, estructuralmente estables y funcionales aun en ambientes con baja actividad de agua (Danson & Hough, 1997).

La suma de los procesos fisicoquímicos y biológicos ayuda a que en el área de cristalizadores el cloruro de sodio de alta pureza precipite en forma de cristales grandes, mismos que son cosechados una vez que el liquido remanente rico en Mg^{++} y K^{+} , que es conocido como “amargos” es removido. Después de que los cristales de

NaCl son cosechados estos son lavados, secados y almacenados hasta su traslado a la planta de refinado.

Es importante destacar que las propiedades físicas y la composición química de las salmueras determina la calidad de la sal cristalizada, por lo que en los procesos establecidos de manera industrial, como es el caso de ISYSA, se monitorea de manera rutinaria, la densidad, la temperatura, la claridad, la viscosidad y salinidad de las charcas salineras ya que los valores de estos parámetros son usados como indicadores para el manejo del sistema de charcas salineras.

Finalmente es importante resaltar que existe la posibilidad de que las charcas salineras sean fuente no solo de NaCl si no también de metabolitos de interés industrial como las enzimas adaptadas a trabajar bajo condiciones de altas presiones osmóticas y bajos niveles de actividad de agua (Setati, 2010).

Nuestro grupo ha venido trabajando en el aislamiento y selección de bacterias halófilas quitinolíticas involucradas el proceso de producción de NaCl (Hau-Heredia, 2009) así como en la valoración de las actividades enzimáticas involucradas en el desarrollo de este proceso (Escamilla-Sánchez *et al.*, 2009) y está interesado en la recuperación y caracterización cinética de estas enzimas, ya que podrían ser pueden ser usadas en ambientes salinos o con bajas actividades de agua en las industrias de los alimentos y farmacéutica (DasSarman & Arora, 2001).

Por lo que el objetivo de este trabajo fue establecer los niveles de actividad enzimática asociadas a la degradación de la materia orgánica; proteasas, lipasas, celulasas y quitinasas presentes en el sistema de charcas salineras de ISYSA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El área de estudio de este trabajo fue el sistema de charcas salineras de ISYSA ubicado en la comunidad de “Las Coloradas” estado de Yucatán; este sistema de charcas salineras cuenta con 27 charcas funcionales, de las cuales 13 fueron sujeto de este estudio,

Muestreo

El muestreo se realizó de la columna de agua y en la zona de sedimentos en la parte central de las charcas estudiadas, usando envase de PET (poli-etilen-tereftalato) de boca ancha, previamente lavados y sanitizados. La recolecta de muestras y la toma de temperatura en los puntos de muestreo se realizaron de manera simultaneas, las muestras se recolectaron por duplicado y se guardaron en una hielera para su transporte al laboratorio de ISYSA.

Manejo de muestras.

En el laboratorio de ISYSA se midió la salinidad (°Be) de las muestras y posteriormente fueron transportadas bajo refrigeración al laboratorio de Biotecnología Enzimática del Instituto Tecnológico de

Mérida (ITM) en donde se les midió el pH y se centrifugaron a 13500 rpm a 4°C, durante 15 min. El sobrenadante libre de células obtenido fue el que se ocupó para realizar las determinaciones de actividad proteolítica, actividad quitinolítica, actividad celulolítica, actividad lipolítica y proteína soluble.

Actividad proteolítica (Kunitz, 1947)

Para esta determinación se usaron 2.0 ml de una solución de caseína al 2.0% en amortiguador de fosfatos 0.2 M de pH 8.0, 7.5 ó 7.3 y la salinidad ajustada, con cloruro de sodio, al valor determinado en cada punto de muestreo. A la solución de caseína se le añadió 1.0 ml de sobrenadante libre de células obtenido de cada punto de muestreo. El desarrollo de la reacción se llevó a cabo a la temperatura promedio de cada charca durante 30 min y se detuvo mediante la adición de 4.0 ml de ácido tricloroacético al 10%. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 13500 rpm, durante 15 min. En el sobrenadante se midió la cantidad de tirosina liberada por acción enzimática, utilizando el método de Lowry *et al.* (1951). El valor de densidad óptica leída a 590 nm fue interpolado en una curva estándar de tirosina (0 a 100 µg/ml)

Actividad quitinolítica (Monreal & Reese, 1969)

En esta determinación se usaron 0.7 ml de una suspensión de quitina coloidal al 1.0% en amortiguador de fosfatos 0.2 M de pH 8.0, 7.5 ó 7.3 y la salinidad ajustada, con cloruro

de sodio, al valor determinado en cada punto de muestreo. A esta suspensión se le adicionó 0.8 ml del sobrenadante libre de células, la mezcla se incubó a 26°C durante una hora, posteriormente se le adicionaron 3 ml de reactivo de DNS (Miller, 1959) y se llevó a ebullición por 5 min, se dejó enfriar y se aforó a 20 ml con agua destilada, se leyó la densidad óptica a 550 nm y los valores obtenidos se interpolaron en la curva estándar de N-Acetil glucosamina.

Actividad celulítica (Mandels, 1976)

Para esta determinación se usó como sustrato una tirilla de papel filtro Whatman No. 1 de 1.0 x 6.0 cm (50 µg de celulosa) que se colocó en 0.7 ml de amortiguador de fosfatos 0.075 M de pH 8.0, 7.5 ó 7.3 y la salinidad ajustada, con cloruro de sodio, al valor determinado en cada punto de muestreo, a los que se les adicionó 0.8 ml del sobrenadante libre de células, la mezcla se incubó a 26°C durante una h, posteriormente se le adicionaron 3 ml del reactivo de DNS (Miller, 1959) y se llevó a ebullición por 5 min se dejó enfriar y se aforó a 20 ml con agua destilada, se leyó la densidad óptica a 550 nm y los valores obtenidos se interpolaron en la curva estándar de glucosa.

Actividad lipolítica (Hoffelman et al., 1985)

La actividad lipolítica se cuantificó usando un sistema de ensayo que contenía 12.8 ml de amortiguador de fosfatos 0.02 M de pH 8.0, 7.5 ó 7.3 y la salinidad ajustada, con cloruro de sodio, al valor determinado en

cada punto de muestreo, 0.3 ml de tributirina y 1.0 ml del sobrenadante libre de células.

Esta mezcla se incubó a 26 °C, durante 15 min y se tomó la lectura de pH inicial y pH final. La diferencia de los valores de pH obtenidos fue interpolada en una curva patrón de pH contra concentración de ácido butírico. Los resultados se reportaron como μ moles de ácido butírico liberados por mililitro de sobrenadante libre de células.

Proteína soluble

La cuantificación de la proteína soluble presente en las salmueras de cada una de las charcas se realizó siguiendo la técnica de Lowry *et al.* (1951) los datos de densidad óptica obtenidos fueron interpolados en una curva estándar de albumina sérica bovina (ASB)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento de las condiciones de ensayo

Para establecer las condiciones de ensayo para cuantificar las actividades

quitinolítica, celulolítica, proteolítica y lipolítica que se producen y que trabajan en el sistema de charcas salineras de ISYSA, se determinaron los valores de, pH, temperatura (°C) y salinidad (°Be) que se tenía a lo largo del sistema. Manejando como puntos de muestreo 13 de las 27 charcas que integran el sistema de charcas salineras de la empresa. La selección de las charcas sujeto a estudio se realizó tomando como criterio el que estas charcas son consideradas por la empresa como los puntos representativos del comportamiento del sistema y que estas charcas han sido estudiadas de manera rutinaria por el Dr. J.S. Davis profesor emérito de la Universidad de Florida, USA

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3, como era de esperarse la salinidad se fue incrementando desde un valor inicial de 8.5 °Be hasta 28.5 °Be, la temperatura se incrementó a lo largo de las charcas salineras de los 22.7 a los 27.5°C. Y en el caso del pH se presentaron fluctuaciones en el valor de este parámetro sin que se presentara ninguna tendencia definida.

Artículos

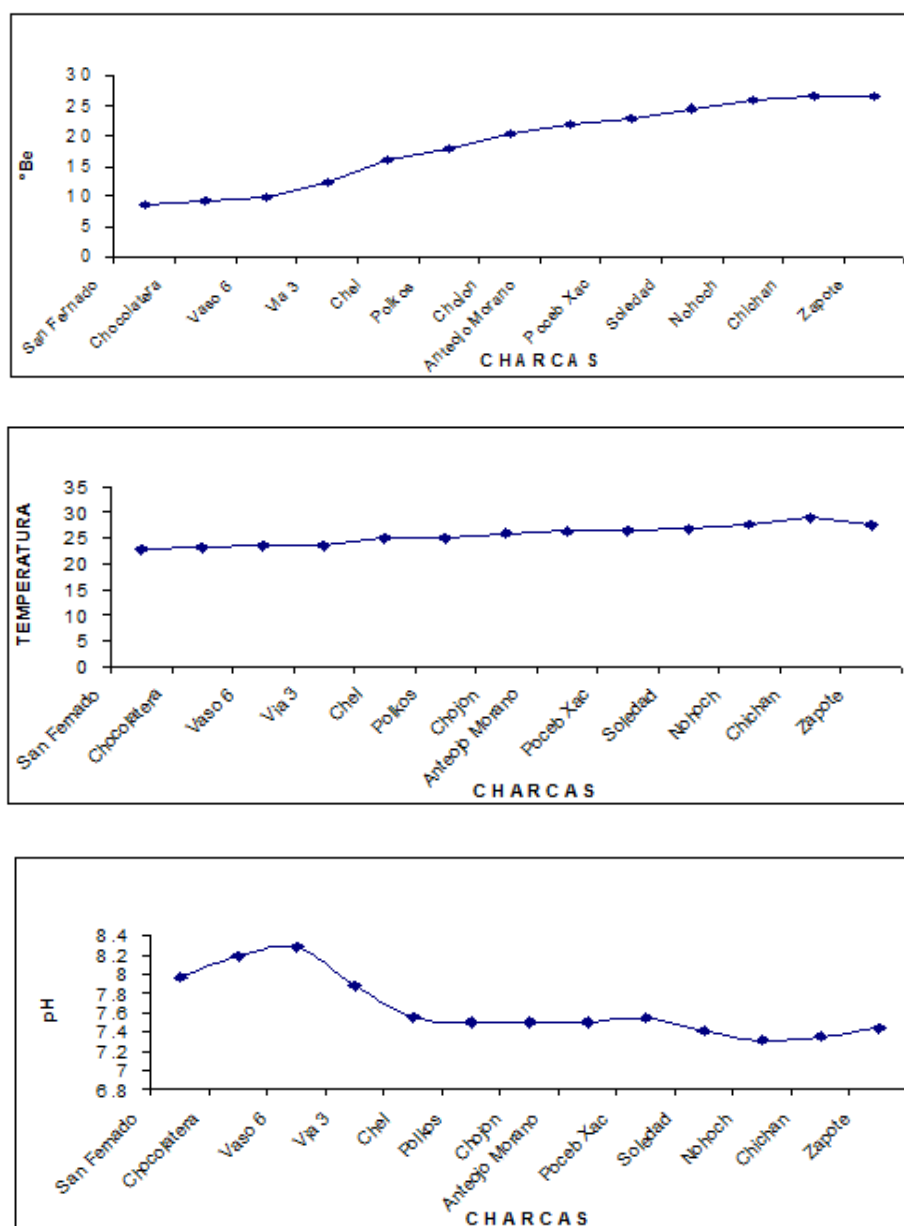


Fig. 3. Evolución de la Salinidad (°Be), la temperatura (°C) y pH en el sistema de charcas salineras de la empresa ISYSA

Tomando estos datos en consideración se decidió que los sistemas de ensayo para la determinación de las actividades enzimáticas se debieran realizar conservando las condiciones de salinidad de

cada una de las charcas, manejando una temperatura de 26°C, valor que se obtuvo al sacar el promedio de las temperaturas existentes en las charcas sujeto de estudio. Y en el caso del pH se decidió manejar el valor

Artículos

de 8, para las charcas San Fernando, Chocolatera, Vaso 6 y Vía 3; 7.5 para las charcas Chel, Polkos, Chojon, Anteojo Morano, Poceb Xac y 7.3 para las charcas Soledad, Nohoch, Chichan y Zapote usando

en todos los casos amortiguador de fosfatos, en la tabla1 se resumen las condiciones de ensayo que se usaron para cada una de las charcas

Tabla 1. Condiciones seleccionadas para la determinación de actividades enzimáticas.

Nombre de las charcas	Salinidad (% NaCl)	pH de ensayo	Temperatura de ensayo (°C)
San Fernando	8.5	8.0	26
Chocolatera	9.2		
Vaso6	9.8		
Vía 3	12.6		
Chel	16.6	7.5	
Polkos	18.7		
Chojon	21.7		
A. Morano	23.2		
Poceb Xac	24.2		
Soledad	26.3	7.3	
Nohoch	27.6		
Chichan	28.3		
Zapote	28.5		

En la tabla 2 se presentan los datos de las actividades volumétricas quitinolítica, celulolítica, proteolítica y lipolítica cuantificadas en la columna de agua y en la zona de sedimentos del sistema de charcas salineras de la empresa ISYSA y como se puede observar el comportamiento de estas

zonas es diferente, siendo la zona de sedimentos la que presento los mayores niveles de actividad enzimática, esto es un indicador de una actividad microbiana más intensa. La charca más activa del sistema fue la denominada “Soledad” ya que presentó buenos niveles de las cuatro actividades

Artículos

enzimáticas evaluadas siendo la actividad quitinolítica la más importante tanto en la columna de agua, 141.04 $\mu\text{mol NaGlu/ml}$, como en la zona de sedimentos, 271.88 $\mu\text{mol NaGlu/ml}$. La segunda actividad más importante resulto ser la celulolítica, 70.07 $\mu\text{mol Glu/ml}$, en la columna de agua y 102.85

$\mu\text{mol Glu/ml}$, en la zona de sedimentos. En esta charca la salinidad expresada en % de NaCl fue del 26.3% por lo que tanto los microorganismo como las enzimas presentes en la misma pueden ser catalogadas como halófilas extremas según lo reportado por DasSarman & Arora (2001)

Tabla 2. Valores de actividad volumétrica en la columna de agua y en la zona de sedimentos del sistema de charcas salineras de ISYSA

COLUMNA DE AGUA					
CHARCA	Actividad quitinolítica $\mu\text{mol NaGlu/ml}$	Actividad celulolítica $\mu\text{mol Glu/ml}$	Actividad proteolítica $\mu\text{mol de Tirosina/ml}$	Actividad lipolítica $\mu\text{mol ac. butírico/ml}$	Proteína soluble ($\mu\text{g/ml}$)
Sn. Fernando	29.61	18.92	0.41	4.46	14.05
Chocolatera	46.26	5.87	0.32	4.29	15.38
Vaso No. 6	43	32.78	0.14	3.75	18.08
Vía No. 3	2.32	27.45	0.49	7.95	17.15
Chel	25.42	11.72	0.82	12.05	14.01
Polkos	25.44	10.67	0.33	11.16	12.75
Chojon		7.46	1.24	9.29	11.83
Anteojito Morano	24.98	57.82	0	0	15.49
Poceb Xac	60.56	76.48	0.83	10.00	8.28
Soledad	141.04	70.07	1.29	13.57	7.24
Nohoch Xac	11.1	18.13	2.28	12.86	11.8
Chichan Xac	22.2	0	0.54	11.96	12.9
Zapote	15.73	21.05	1.04	12.05	8.76
ZONA DE SEDIMENTOS					
Sn. Fernando	25.89	8.51	0.02	8.57	13.98
Chocolatera	3.7	59.16	0.03	3.39	19.9
Vaso No. 6	0.02	0	0.23	2.68	12.72
Vía No. 3	22.65	21.86	0.01	0.89	13.75
Chel	30.04	59.94	0.93	11.96	12.61
Polkos	44.4	12.26	0.55	9.29	18.27
Chojon		54.9	0.29	10.98	17.52
Anteojito Morano	280.67	52.5	1.11	9.73	10.24
Poceb Xac	133.18	46.9	0.36	9.11	12.16
Soledad	271.88	102.86	0.55	12.59	8.65
Nohoch Xac	51.8	13.05	3.6	12.68	7.35
Chichan Xac	0	0	0	0	0
Zapote	0	0	0	0	0

Artículos

Cuando se calcularon las actividades enzimáticas específicas, tabla 3, se encontró que de la proteína soluble total, presente en la columna de agua de esta charca, el 31.21% de la misma es una mezcla de las actividades quitinolítica (19.48%), celulolítica (9.68%), proteolítica (0.18%) y lipolítica

(1.87%). Esto quiere decir que de los 1987 kg de proteína soluble total que potencialmente podrían ser recuperados de esta charca, (tabla 4) 387.07 kg serían de enzimas quitinolíticas, 192.34 kg de enzimas celulolíticas, 3.58 kg de enzimas proteolíticas y 37.16 kg de enzimas lipolíticas.

Tabla 3. Valores de actividad específica en la columna de agua y en la zona de sedimentos del sistema de charcas salineras de ISYSA

COLUMNA DE AGUA				
CHARCA	Actividad específica quitinolítica $\mu\text{mol NaGlu}/\mu\text{g proteína}$	Actividad específica celulolítica $\mu\text{mol Glu}/\mu\text{g proteína}$	Actividad específica proteolítica $\mu\text{mol de Tirosina}/\mu\text{g proteína}$	Actividad específica lipolítica $\mu\text{mol ac. butírico}/\mu\text{g proteína}$
Sn. Fernando	2.11	1.35	0.03	0.32
Chocolatera	3.01	0.38	0.02	0.28
Vaso No. 6	2.38	1.81	0.01	0.21
Vía No. 3	0.14	1.60	0.03	0.46
Chel	1.81	0.84	0.06	0.86
Polkos	2.00	0.84	0.03	0.88
Chojon	0.00	0.63	0.10	0.78
Anteojito Morano	1.61	3.73	0.00	0.00
Poceb Xac	7.31	9.24	0.10	1.21
Soledad	19.48	9.68	0.18	1.87
Nohoch Xac	0.94	1.54	0.19	1.09
Chichan Xac	1.72	0.00	0.04	0.93
Zapote	1.80	2.40	0.12	1.38
ZONA DE SEDIMENTOS				
Sn. Fernando	1.85	0.61	0.00	0.61
Chocolatera	0.19	2.97	0.00	0.17
Vaso No. 6	0.00	0.00	0.02	0.21
Vía No. 3	1.65	1.59	0.00	0.06
Chel	2.38	4.75	0.07	0.95
Polkos	2.43	0.67	0.03	0.51
Chojon	0.00	3.13	0.02	0.63
Anteojito Morano	27.41	5.13	0.11	0.95
Poceb Xac	10.95	3.86	0.03	0.75
Soledad	31.43	11.89	0.06	1.46
Nohoch Xac	7.05	1.78	0.49	1.72
Chichan Xac				
Zapote				

Artículos

Tabla 4. Volumen de salmuera y contenido de proteína soluble que maneja el sistema de charcas salineras de ISYSA

Charca	Volumen (m ³)	Proteína soluble (g/m ³)	Proteína solubles total (kg)
San Fernando	156278	14.05	2195.71
Chocolatera	347332	15.38	5341.97
Vaso No. 6	578058	18.08	10451.29
Vía No. 3	920337	17.15	15783.78
Chel	1269962	14.01	17792.17
Polkos	400374	12.75	5104.77
Chojón	441835	11.83	5226.91
Anteojito Morano	124478	15.49	1928.16
Poceb Xac	229880	8.28	1903.41
Soledad	274448	7.24	1987.00
Nohoch Xac	130975	11.8	1545.51
Chichan Xac	131800	12.9	1700.22
Zapote	232200	8.76	2034.07

Estos datos dejan entrever que eventualmente en los sistemas de charcas salineras de la empresa ISYSA podrían recuperarse, además del cloruro de sodio, extremozimas halófilas de interés industrial que están siendo producidas de manera simultánea al proceso de clarificación de las salmueras. Para ello sería necesario establecer las condiciones de manejo de las charcas para implementar un procedimiento de recuperación de estas enzimas sin alterar el proceso de clarificación de las salmueras.

En este contexto, resulta atractivo cuantificar la presencia de este tipo de enzimas en los efluentes que se generan en la zona de cristalizadores “Amargos” para evaluar la posibilidad de que estos pudieran

ser usados como materia prima para la recuperación de enzimas halófilas extremas.

AGRADECIMIENTOS

Sirva este documento, para rendir un pequeño homenaje a mi maestro y amigo Dr. Carlos Huitrón Vargas, de quien recibí lecciones académicas y de vida que me han permitido desarrollarme como profesor y profesionalista en el área de la biotecnología enzimática y microbiana. ¡Mil gracias Dr. Huitrón! siempre estaré profundamente agradecido con usted.

REFERENCIAS

- Danson MJ & Hough DW (1997) The structural Basis of protein halophilicity. *Comp. Biochem. Physiol.* 117A (3): 307-312
- Davis JS & Giordano M (1996) Biological and Physical events involved in the origin, effects, and control of organic matter in solar Saltworks. *Int. J. Salt Lake Res.* 4:335-347.
- DasSarman S & Arora P (2001) Halophiles Encyclopedia of life Sciences, *Nature publishing Group*, 1-9
- Escamilla-Sánchez JB, Cabrera-López S, Tello-Cetina J, Solís-Pereira S, Ordoñez-López U, Ortiz-Milan S & Rivera-Muñoz G (2009) Application of canonical correlation analysis in solar saltworks enzymatic activities evolution: proteolytic activity case. In Proceedings of the International Conference on the ecological Importance of Solar Saltworks (CEISSA 2009). Lekkas, T.D.and Korovertis, N.A. eds. Mérida, Yucatán, México. Pp. 34-41
- Grant WD (2004) Life at low water activity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 359: 1249-1267
- Hau-Heredia L, Granados-Baeza MJ, Cardos-Vidal A, Escamilla-Sánchez JB, Solís S, Ortiz-Milan S & Rivera-Muñoz G (2009) Chitinolytic Bacterial Isolation from solar Saltworks. In Proceedings of the International Conference on the ecological Importance of Solar Saltworks (CEISSA). Lekkas, T.D.and Korovertis, N.A. eds. Mérida, Yucatán, México pp. 57-62
- Hoffelman M, Hartman J, Zinn A & Scherier P (1985) Isolation, purification and characterization of lipase isoenzymes from technical *Aspergillus niger* enzyme. *J. Food Sci.* 50: 1721-1725
- Kunitz M (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J.Gen. Physiol.* 30: 291-310.
- Liaw HJ & Mah RA (1992) Isolation and Characterization of Haloanaerobacter chitinovorans ge. Nov., sp. Nov., a halophilic, anaerobics, chitinolytic bacterium from a solar saltern. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1): 260-266
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Mandels M, Andreotti R & Roche C (1976). Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6:21-33.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(3): 426-428.
- Monreal J & Reese ET (1969) The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* 15: 689-696.
- Setati ME (2010) Diversity and Industrial potential of hydrolase-producing halophilic/halotolerant eubacteria. *African J. Biotechnol.* 9 (11): 1555-1560
- Shivanand P & Jayaraman G (2009) Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris*

Artículos

VIT isolated from Kumta coast. *Proc. Biochem.* 44: 1088-1094
VijayAnad S, Hemapriya J, Selvinb J & Kiran S (2009) Production and optimization of

haloalkaliphic protease by an extremophile *Halobacterium* SP Js !, Isolated from thalassohaline environment. *African J. Basic Appl. Sci.* 1 (4): 49-54

El Estado Actual del Proteoma de *Aspergillus*

Lizzete Ruth Torres y Guillermo Aguilar Osorio*

Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Conjunto E, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, C.P. 04510. México, D.F., México. Tel: 56225306 E-mail: gao@unam.mx

RESUMEN

La proteómica estudia mezclas complejas de proteínas que proceden de muestras biológicas como cultivos de bacterias u hongos, pero también de plantas o tejidos de mamíferos y nos da información sobre la síntesis de proteínas, su distribución, vías de secreción, así como la respuesta fisiológica de un organismo a la variación de las condiciones ambientales. Estas diferencias son representadas en forma de patrones de proteína obtenidas bajo diferentes condiciones y se denomina patrones de expresión diferencial, que son aprovechados para identificar proteínas útiles en diversas funciones. En el campo biotecnológico, las proteínas de hongos como el género *Aspergillus* poseen un alto impacto en la actividad humana, pues se utilizan en la elaboración de aditivos, alimentos, clarificación de bebidas o en el mejoramiento de la calidad del papel. También se elaboran con ellas medicamentos, antibióticos y otras proteínas que permiten establecer nuevas técnicas de diagnóstico de enfermedades como el cáncer, infecciones bacterianas y de otros tipos. Todo esto es posible gracias a la manipulación de las condiciones ambientales en el medio y la respuesta del hongo ante ellas.

Palabras clave: *Aspergillus*, proteómica, secretoma.

ABSTRACT

Proteomics is the global analysis of complete sets of proteins from a great diversity of complex mixtures of biologic samples. The changes on protein patterns named, differential expression, could provide us information about the function of specific proteins or the response of an organism to environmental changes. This information is used in benefit of society to identify protein to establish new techniques and protocols to diagnose some diseases as cancer, bacterial or virus infections and other kind of conditions. Fungal proteomics has been developed recently, even when some fungus are industrially relevant. *Aspergillus* has a big impact on biotechnology due to its ability to produce antibiotics, drugs, enzymes and food additives. Due to *Aspergillus* is able to grow in unfavorable conditions, is capable to secrete a wide range of enzymes to take advantage of circumstances. Some other secreted proteins are used as antigens to produce specific vaccines. In the end all proteins either extra- or intracellular could come as result of environmental changes.

Key words: *Aspergillus*, proteomics, secretome.

INTRODUCCIÓN

Desde la década pasada, cuando se completó la secuenciación del genoma humano, el desarrollo de nuevas y más eficientes técnicas de secuenciación masiva de DNA, aceleró la generación de conocimiento que prometía proporcionar la información suficiente para entender plenamente los mecanismos biológicos y con esto mejorar la obtención de medicamentos o implementar nuevos tipos de terapias (Thomas *et al.*, 2003). Sin embargo, la información arrojada por el estudio del genoma no ha sido suficiente para comprender la complejidad de los sistemas eucariontes, pues la presencia de un gen no conlleva necesariamente su expresión para producir un RNA mensajero, que a su vez, de lugar a una proteína activa. Proteína, que por otra parte, está sujeta a un riguroso control de activación y demás modificaciones postraduccionales (Glazer *et al.*, 2007). Otras técnicas como los microarreglos y la tecnología de PCR en tiempo real se sumaron a la genómica, y han favorecido la generación de información que permite entender algo más de los sistemas biológicos, abriendo también la puerta a la proteómica (Klein *et al.*, 2004).

El término "Proteómica" fue acuñado a finales de los años 90 para describir el estudio de proteínas a gran escala, es decir, un gran grupo de proteínas que provienen de una misma línea celular u organismo (Pandey *et al.*, 2000). Con estos alcances, pronto fue evidente que la proteómica era una tarea compleja, pues un paso crítico en el establecimiento de las condiciones

particulares de trabajo está relacionado con el tratamiento de la muestra.

Una herramienta muy importante en la proteómica ha sido la electroforesis en dos dimensiones (2 DE) (O' Farrel, 1975). Con esta técnica se dio un salto hacia el estudio de grupos completos de proteínas, no obstante esta prometedora técnica mostraba inconvenientes debidos a la baja reproducibilidad del método, por lo que fue temporalmente abandonada. Tiempo después fue retomada, no sin antes haber sufrido diferentes modificaciones dirigidas a mejorar la resolución de la separación de las proteínas (Görg *et al.*, 2000). A la par nuevas técnicas de análisis y separación de proteínas fueron emergiendo como las denominadas "libres de gel" implementadas originalmente para proteínas de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, o las técnicas de Análisis Multidimensional de Proteínas (MudPiT por sus siglas en inglés), que involucran el uso de cromatografía acoplada a espectrometría de masas, sin una separación previa por electroforesis (Washburn *et al.*, 2001). Otras tecnologías de análisis de proteínas más sofisticadas incluyen los arreglos de proteínas (Zhu *et al.*, 2001), la marcación por afinidad isotópica conocida como ICAT (por sus siglas en inglés). Esta técnica consiste en la marcación con biotina unida a protinio (1H) o deuterio (2H) unido a un brazo con marcaje (D0 o D8) y a una iodo acetamida que reacciona covalentemente con tioles unidos a residuos de cisteína de una muestra de proteínas previamente reducida y desnaturalizada (Gygi *et al.*, 1999). Otra

técnica recientemente implementada es el marcaje de aminoácidos en cultivo con isótopos estables (SILAC por sus siglas en inglés), que incorpora aminoácidos con marcaje radioactivo al metabolismo (Ong *et al.*, 2002) o el marcaje isobárico de aminos reactivos acoplado a masas (iTRAQ-MS/MS). Ambos son métodos actualmente utilizados para reducir la complejidad de las mezclas de péptidos (Parviainen *et al.*, 2011). Así, el tratamiento que se dé a las muestras y la concentración de las proteínas de interés dan la pauta para seleccionar el mejor método de análisis, no sin antes sortear dificultades durante la recuperación de proteínas y que se asocian con la presencia de sustancias propias de la naturaleza de la muestra, generando interferencias en los análisis. Independientemente del tipo de separación o análisis elegido, el uso de la proteómica ha incrementado en los últimos años, pues se reconoce su utilidad como una poderosa herramienta de análisis en biotecnología. En el área clínica, las proteínas identificadas por medio de estudios proteómicos son utilizadas como marcadores moleculares, que permiten asociar su presencia directamente con enfermedades específicas como el cáncer o ciertos tipos de infecciones (Encarnación *et al.*, 2005), (Song *et al.*, 2008). La relación que las proteínas guardan con la respuesta de un organismo ante la infección es actualmente investigada con ahínco (Chearkady *et al.*, 2008). Ejemplos de esto son un estudio recientemente publicado sobre el análisis de las proteínas del fluido cerebro espinal

utilizado para identificar infecciones del virus de VIH en etapas tempranas (Angel *et al.*, 2012) o el estudio de las proteasas producidas por *Plasmodium falciparum*, el agente responsable de la malaria (Lilburn *et al.*, 2010). Una de las especies fúngicas patógenas para humanos es *Aspergillus fumigatus*, que es responsable de causar aspergilosis, una infección invasiva muy común en hospitales, y que está asociada con el 90% de mortandad en pacientes inmunocomprometidos (Carberry *et al.*, 2007). No todos los representantes del género *Aspergilli* presentan riesgos para los humanos, pues la mayor parte de estos hongos son saprófitos de vida libre, capaces de utilizar una gran variedad de materiales en descomposición como fuentes de carbono y nitrógeno. Estas características han sido explotadas por las que actualmente poseen particular importancia en el desarrollo de procesos biotecnológicos (Tekaia *et al.*, 2005). De hecho, son ampliamente utilizados en la industria de alimentos, como en la producción de fermentados de la cocina tradicional japonesa, así como la elaboración de aditivos para alimentos y medicamentos de tipo esteroideo. Algunos procesos que involucran cultivos de hongos incluyen la panificación (Camacho & Aguilar 2003), elaboración y clarificación de bebidas, la producción de antibióticos, enzimas (Polizeli *et al.*, 2005), ácidos orgánicos y alcoholes (Witteveen *et al.*, 1995), así como otros productos farmacéuticos (Bennett, 1998), de tal forma que resulta sorprendente el hecho de que la investigación del proteoma de

Aspergillus este aún restringida a unas cuantas especies.

El propósito de este trabajo es revisar el estado actual de la investigación del proteoma de *Aspergillus*, abordando los inicios de la investigación en esta área, el desarrollo de este campo y una breve revisión cronológica de algunos de los trabajos más representativos sobre la investigación de la respuesta de estos hongos a diferentes condiciones.

Obtención y preparación de la muestra

Los primeros esfuerzos de investigación proteómica no se enfocaron en la separación de las proteínas propiamente, de hecho el principal problema fue obtener mezclas de proteínas con la calidad adecuada para analizar. Esto es; el origen de la mezcla proteica determina el protocolo a seguir. Así, para obtener concentraciones suficientes de las proteínas, que sea de buena calidad y representativas de la

muestra original, es necesario aplicar un tratamiento particular a cada una de ellas, dependiendo de su origen. Esto se debe a que no es lo mismo tratar proteínas de plasma sanguíneo o tejidos humanos o animales que muestras que provienen de tejidos vegetales. En el primer caso, la presencia de proteínas de alta abundancia como albúmina e inmunoglobulina enmascaran a la proteína de interés y suele ser un problema importante y difícil de resolver en estudios de tipo clínico principalmente (Ritorto & Borlak, 2011) mientras que la presencia de sales, polisacáridos y fenoles es un problema más característico de tejidos vegetales e incluso algas (Chan, *et al.*, 2002). Retirar impurezas de la muestra no es una trivialidad pues representa buena parte del trabajo total. La tabla 1 muestra las principales interferencias para la separación en 2-DE y sus consecuencias.

Tabla 1. Mayores interferencias en 2DE y sus consecuencias

Interferencias	Consecuencias
Sales, buffer residual y otras pequeñas moléculas con carga	Las sales interrumpen el proceso de electroforesis. Durante el isoelectroenfoque generan alta conductividad en la tira de gel, prolongando el tiempo de separación
Pequeñas moléculas iónicas endógenas (nucleótidos, metabolitos, fosfolípidos)	Estas sustancias son cargadas negativamente y causan una pobre separación en el ánodo
Albúmina y otras proteínas de alta abundancia	Albúmina e IgG son los mayores componentes proteicos del suero humano. Su alta concentración puede enmascarar la presencia de otras proteínas con punto isoelectrónico o peso molecular semejante.
Detergentes iónicos	El SDS normalmente utilizado puede interferir fuertemente con el isoelectroenfoque formando complejos con proteínas donde aquellos negativamente cargados no serán separados
Ácidos nucleicos	El incremento en la viscosidad de la muestra genera la formación de fondo. Los ácidos nucleicos de alto peso molecular pueden ocluir los poros del gel. Se pueden unir a las proteínas formando complejos que no se resuelven
Polisacáridos	Pueden ocluir los poros del gel causando precipitación o extensión de los tiempos de isoelectroenfoque, generan estriado horizontal y causan interacción con proteínas con carga negativa
Lípidos	Reducen solubilidad de la muestra. Pueden afectar el pI y peso molecular aparente de las proteínas. Forman complejos con detergentes reduciendo su efectividad
Compuestos fenólicos	Pueden modificar proteínas por medio de una reacción catalizada por enzima
Material insoluble	Puede ocluir los poros del gel

Sumado a lo anterior, establecer un método adecuado de determinación de proteína en estudios proteómicos puede ser un gran reto cuando la muestra aún no posee la calidad adecuada y presenta componentes diferentes de las proteínas. Esto se debe a que la determinación puede variar en función de las impurezas presentes, de acuerdo con la naturaleza del método de ensayo seleccionado (Okutucu *et al.*, 2007). Fragner, *et al.*, (2008), encontró que la concentración de proteína puede variar dramáticamente dependiendo del método utilizado para su cuantificación. Estos autores usaron tres diferentes técnicas de análisis; Bradford, Lowry y el método del ácido bicinconínico BCA (por sus siglas en inglés) para determinar los niveles de proteína de cultivos de *Coprinopsis cinerea*. Ellos observaron diferencias importantes para la misma muestra de proteína determinada con dichos métodos. Los valores que determinaron oscilaron entre 42.9 ± 2.3 , 738.9 ± 51 y $1701.7 \pm 253 \mu\text{g/mL}$ empleando los protocolos de Bradford, Lowry y BCA, respectivamente. Al observar diferencias tan dispares, optaron por determinar la cantidad de proteína por densitometría en SDS-PAGE, extrapolando su valor a geles de 2-DE, demostrando así que dadas las variaciones halladas en sus determinaciones, ningún método es 100% confiable en casos como este.

En el caso de *Aspergillus*, existe una gran lista de componentes propios de sus cultivos que causan variabilidad en las determinaciones de proteína. Precisamente,

en cultivos de *Aspergillus* sección *nigri* existen al menos 150 metabolitos secundarios y micotoxinas bien descritos en estas especies, 30 de los cuales están espectrofotométricamente caracterizados con máximos de absorción alrededor de los 280 nm (Nielsen *et al.*, 2009). Esto representa un problema debido a que algunos de estos pueden dificultar una adecuada determinación de proteínas con los diferentes métodos, pues cada uno presenta incompatibilidad con diferentes sustancias. El método de Bradford por ejemplo, es uno de los más empleados y tiene como principio la unión de un colorante con aminoácidos básicos o aromáticos. De tal forma que la presencia de interferencias, particularmente de compuestos aromáticos vuelve incierta la determinación precisa de proteínas (Bradford *et al.*, 1976). La tabla 2 muestra los principales métodos de determinación de proteína, fundamento y algunas sustancias incompatibles.

Cuando el tratamiento de la muestra y la determinación de proteínas se han resuelto, puede surgir un nuevo problema: la adecuada solubilización de las proteínas para obtener una buena resolución en la separación. Unos de los pioneros en este tema fueron Nandakumar *et al.* (2002), en cuyo trabajo recuperaron y analizaron proteínas obtenidas a partir de cultivos de *Aspergillus oryzae*. Ellos probaron diferentes métodos de lisis celular; rompimiento mecánico con perlas de vidrio, lisis alcalina y ebullición con NaOH 0.2 N, ebullición de la muestra con SDS y lisis con un reactivo

Tabla 2. Métodos de determinación de proteína, principios e incompatibilidades

Método	Principio	Características	Incompatibilidades
Lowry	Desarrollo de color por interacción de cobre y aminoácidos aromáticos potencializadas por formación de complejo cobre-proteína reducido por Fosfomolibdato-Fosfotungstico.	Basado en el método de Biuret, pero es 100 veces más sensible. Detecta 1 a 20 µg de proteína. La muestra es medida por cambio de absorbancia a 750 nm.	Depende del contenido de tirosina y triptófano de la muestra. Fenoles (excepto nitrofenol), ácido sulfosalicílico y timol reducen especificidad. Iones como potasio, magnesio, EDTA, Tris, tioles y carbohidratos causan interferencias (Lowry, 1951).
Bradford	Unión específica de azul brillante de Coomassie-R250 y aminoácidos alcalinos como arginina y aminoácidos aromáticos en medio ácido	Este método es más sensible que Lowry. Detecta desde 1 a 10 µg de proteína. La muestra se mide a 595 nm frente a una curva estándar de albúmina de suero-bovino.	Depende del contenido de arginina y aminoácidos aromáticos en la muestra. Fenoles y otros grupos aromáticos presentan interferencia en la determinación, así como la presencia de Tris, glicerol, tritón X-100 y acetona (Bradford 1976), (Compton, 1985).
Ácido Bicinconínico (BCA)	Reducción del ión Cu^{2+} a ión Cu^{1+} con formación del complejo púrpura y formación de complejo de la sal conjugada del ácido bicinconínico en medio alcalino	Es otra mejora al método de Biuret. El ácido bicinconínico se une selectivamente al Cu^{1+} , formando un complejo que se determina a 562 nm. y puede detectar desde 5 a 250 µg/mL	Depende también de la presencia de aminoácidos aromáticos, pero es menos susceptible a interferencias. Solo concentraciones superiores a 1% de detergentes pueden reducir la reproducibilidad del método (Smith 1985).
Nano naranja	Formación de complejo entre proteína y reactivo nano naranja	Desarrollo de fluorescencia determinada a 485/590 nm. formación de un complejo muy estable	Sensible a la presencia de DTT, sales, EDTA, CaCl_2 , y principalmente bajas concentraciones de SDS, Tween 20 y Tritón X100 (García-Arellano y Vázquez-Duhalt 1998).

comercial llamado Y-PER (Thermo Fischer Scientific Inc. Rockford, IL, USA). Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y 2-DE, hallando que en tres de los cuatro casos (solución alcalina, Y-PER and SDS) algunas de las proteínas se perdían durante el tratamiento. En muestras tratadas con Y-PER particularmente se perdían aquellas con peso molecular menor a 30 kDa, con solución alcalina caliente las bandas de proteínas se distribuían en todos los pesos moleculares, pero perdían mucha proteína, mientras que con detergente caliente perdieron bandas de proteínas con peso molecular superior a 90 KDa. El tratamiento mecánico resultó aportar mayores beneficios, pues no solo se obtenía una

concentración mayor sino que se distribuían en todos los pesos moleculares. No obstante, la calidad de las proteínas que obtenían no era suficiente para realizar una adecuada separación en SDS-PAGE o 2-DE. Al año siguiente, (Nandakumar *et al.*, 2003) propusieron una técnica complementaria en la que el extracto proteico era precipitado usando una solución de TCA y solubilizado en una solución de NaOH 0.2 N antes de realizar la separación electroforética. Al solubilizar directamente en solución de NaOH, evitaban la serie de lavados con acetona post-precipitación recomendado en el método tradicional y además mejoraron la solubilidad de su muestra en buffers

desnaturalizantes tanto para emplear protocolos de SDS-PAGE como para 2-DE.

Problemas semejantes se han observado con muestras de cultivos de otros hongos, como el basidiomiceto *Coprinopsis cinérea* crecido en medio líquido con glucosa. En un estudio en el que probaron al menos tres diferentes métodos de precipitación, seleccionaron una solución de TCA/acetona como el método más adecuado. Sin embargo, observaron que el principal inconveniente, fue la mala solubilización del precipitado, que ni la adición NaOH antes propuesta por Nandakumar *et al.* (2003) ni la sonicación de la muestra fue suficiente lograr su adecuada solubilización. Optaron por ajustar el pH del precipitado con solución amortiguadora de Tris para solubilizarla (Fragner *et al.*, 2009), demostrando una vez más que en protocolos de proteómica no hay nada escrito y todo depende de las características de la muestra.

La diversidad de la investigación proteómica

A pesar de las limitantes que puede presentar la proteómica, como la dificultad para establecer protocolos estándar para el tratamiento de muestras, la considerable variación por las técnicas de determinación de proteínas o la elección del método de secuenciación empleado, se le reconoce como una compleja y poderosa herramienta de análisis. Esto es porque permite ampliar el espectro de estudio, desde proteínas puntuales como se había hecho todavía en años recientes, hasta grupos completos de proteínas, multiplicando así la información

que se obtiene en cada experimento. Es tanta la información que puede generarse incluso dentro en el estudio de un solo organismo, que existe un número ilimitado de enfoques posibles. Recientemente se han publicado trabajos que se especializan en el análisis del proteoma de fracciones subcelulares u organelos específicos, la fracción intracelular citoplasmática haciendo especial énfasis en las relaciones que estas proteínas tienen en vías metabólicas. Así, podemos encontrar estudios proteómicos especializados en proteínas de secreción, que reciben el nombre de secretomas o estudios relacionados con proteínas de pared celular, proteínas intracelulares, o de organelos particulares. Estos estudios se han denominado sub-proteomas y la información que se genera se relaciona con estudios del genoma, transcriptoma o metaboloma de las especies estudiadas, ampliando así la comprensión de los mecanismos y estrategias utilizadas por el sistema de estudio. De hecho, la asociación de las diferentes áreas de la proteómica y su vinculación con el genoma y transcriptoma han hecho posibles grandes avances en la integración del conocimiento. A continuación se presenta una descripción de los estudios más relevantes en proteómica de *Aspergillus*, que han sido divididos en áreas de acuerdo con el origen las proteínas de interés.

Secretoma

El pionero en el estudio de un secretoma de *Aspergillus* fue Medina (Medina *et al.*, 2004), que estudió el efecto

de la rutina, un flavonoide usado desde principios del siglo pasado para tratar la “debilidad” capilar, asociada con la hipertensión (Bustinza & Caballero 1948) en la secreción de proteínas por *Aspergillus flavus*. El estudio de Medina, se basó en el tipo de proteínas secretadas por *A. flavus* en medio agar papa-dextrosa con y sin rutina. Observaron importantes cambios en la morfología del micelio de *A. flavus* en ambas condiciones. A pesar de que en estudios preliminares habían observado que en medios inducidos con rutina se producían, concentraciones de proteína tres veces mayores, al determinar nuevamente la concentración de proteína en ambas condiciones, no obtuvieron datos contundentes que indicaran que la rutina estimulara de manera importante la secreción. Sin embargo, las diferencias fueron asociadas con en el tipo más que con la cantidad de proteínas producidas en cada condición. Utilizaron un sistema acoplado de 2-DE y MALDI-TOF/MS con el que identificaron 22 proteínas secretadas en medio con rutina y que estuvieron ausentes en los cultivos sin rutina. Entre las proteínas más abundantes hallaron enzimas de tipo glucosilhidrolasas como α -amilasas, α -L arabinofuranosidasa, α -manosidasa y β -galactosidasa, además de proteasas y enzimas que intervienen en el metabolismo oxidativo. Un año más tarde, extendieron su trabajo al incluir la comparación de proteínas obtenidas en cultivos con glucosa (Medina *et al.*, 2005), hallando 16 proteínas extracelulares comunes en los cultivos con glucosa y agar papa dextrosa con o sin

rutina, 18 proteínas que se hallan solo en presencia de rutina, 10 únicamente en glucosa y dos solo en PDA. Tanto las proteínas exclusivas de una condición como las demás fueron clasificadas en tres grupos principales: Enzimas del metabolismo de carbohidratos, enzimas relacionadas con proteólisis o peptidólisis y enzimas con actividad oxido-reducción. A pesar del extenso estudio, la información que obtuvieron indica que las proteínas producidas en las tres condiciones son tan diversas que no fue posible relacionarlas para establecer un patrón particular de proteínas para cada condición.

El mismo año, un grupo de investigación japonés (Zhu *et al.*, 2005) realizaba el análisis de las proteínas secretadas durante la germinación de las conidias de *A. oryzae* en medio con glucosa. Ellos estudiaron la relación entre la aparición de los túbulos germinales y las proteínas que son secretadas durante el proceso. Entre las proteínas más abundantes que identificaron se encontraba una Taka-amilasa A (TAA), seguida de Glucoamilasa A (GLAA) y Aspergillopepsina A (PEPA). Durante la revisión informática de las proteínas encontraron que su identidad podía variar entre ellas, es decir; una de las proteínas podía ser identificada como Taka amylasa A o como Aspergillopepsina con porcentajes de identidad muy semejantes en las diferentes bases de datos consultadas, haciendo más difícil su confiable identificación. Esta discrepancia se explica por la naturaleza del análisis, ya que las proteínas fueron identificadas por huella

digital o Peptide Mass Finger Printing (PMFP), una técnica ampliamente difundida durante los inicios de la investigación en proteómica, que si bien sigue siendo utilizada, es más recomendada para la identificación de mezclas simples o proteínas puras y no para mezclas complejas, ya que depende en gran medida del azar al analizar un péptido aleatorio, razón por la cual se requiere un porcentaje alto de cobertura en el análisis (Mann *et al.*, 2001). Esta característica ha hecho que el análisis de huella digital fuera desplazado como método de análisis, tan pronto como se implementaron los sistemas de espectrometría de masas acoplado a masas (MS/MS) que mejoraron la capacidad de identificación de secuencias por medio del análisis simultáneo de péptidos múltiples. Este sistema no está sujeto al análisis aleatorio de un solo péptido como con PMFP (Heakman *et al.*, 2007), evidenciando que hace falta considerar también el método de análisis y secuenciación como una variable más en el análisis proteómico.

Por otra parte, también un grupo de investigación japonés (Nguyen *et al.*, 2005) complementó el trabajo anterior, demostrando que la enzima Taka amilasa está presente incluso mucho antes de la germinación de las conidias, independientemente de la fuente de carbono utilizada. Cuando probaron almidón, glucosa y glicerol, observaron que la secreción de esta enzima se daba independientemente de la fuente de carbono utilizada por las conidias, indicando que podría tratarse de una enzima

constitutiva y que posee gran importancia como parte de los mecanismos de germinación conidial.

Por otra parte, en un estudio en el que se empleó salvado de trigo en medio líquido y sólido (Biesebeke *et al.*, 2006) se identificaron 5 diferentes proteínas procedentes del cultivo de *A. oryzae*. Las proteínas obtenidas en ambas condiciones fueron separadas por SDS-PAGE y sus secuencias fueron obtenidas por análisis del amino terminal por degradación de Edman. Las diferencias observadas en los patrones de proteínas fueron escasas pero lograron identificar una α -amilasa, una arabinosidasa A y una xilanasas en medio líquido, mientras que en medio sólido solo identificaron una quitinasa y una formato deshidrogenasa, mientras que tres proteínas más no fueron identificadas. El mismo año se publicó uno de los trabajos más completos en lo que se refiere a proteínas de secreción en cultivos de *Aspergillus* (Oda *et al.*, 2006) pues está centrado en el análisis de proteínas de *A. oryzae* en cultivo sumergido y sólido. En este trabajo observaron una diferencia dramática en el número y concentración de proteínas secretadas en cultivo sólido y sumergido, obteniendo 53 y 77 mg de proteína/g de micelio en medio sólido en 32 y 40 horas de cultivo respectivamente, mientras que en medio líquido se alcanzaron solo 13 y 11.9 mg de proteína/g de micelio en los mismos tiempos de cultivo. Al analizar los patrones de proteínas, observaron que para 0-12 h existen proteínas de bajo peso molecular distribuidas en puntos isoelectrónicos de 4.5-

5.5. A las 12 h la imagen de 2DE muestra una mancha de proteína que fue identificada como α -amilasa y que permaneció hasta el final del cultivo (40 h), incluso cuando todos los patrones de proteínas cambiaron mostrando proteínas de alto peso molecular mayoritariamente distribuidas en puntos isoelectrónicos ácidos. Observaron también 8 proteínas comunes al cultivo líquido y sólido que fueron: Taka amilasa A, β -glucosidasa, precursor de proteasa alcalina, xilanasas F3, α -L-arabinofuranosidasa, xilanasas G1, catalasa B y una proteína identificada como xilosidasa/arabinosidasa. Estos resultados fueron congruentes no solo con los de Biesebeke (Biesebeke *et al.*, 2006) sino con los de Zhu (Zhu *et al.*, 2005) ambos mencionados antes, en los que la Taka amilasa tiene un papel importante incluso desde la aparición del túbulo germinal durante la germinación de las esporas. Taka amilasa A, fue ubicada por Oda como una proteína de unión a pared celular que se presenta en condiciones de cultivo sumergido pero que es principalmente de secreción en cultivo sólido.

Un nuevo estudio sobre las proteínas de *A. oryzae* obtenidas en cultivos para la producción de salsa de soya (Liang *et al.*, 2009) reveló información interesante relativa a la similitud entre las proteínas aquí halladas y las identificadas en el trabajo de Oda (Oda *et al.*, 2006), incluso cuando las condiciones de cultivo fueron completamente diferentes. Observaron que a pesar de que la salsa de soya es un medio sumamente abundante en proteínas en el que esperaban un perfil de expresión

diferencial rico en proteasas, solo tres de las proteínas que lograron identificar lo eran: alanil dipeptidil peptidasa, glutaminasa, que habían sido descritas ya por Oda en cultivos con salvado de trigo, y aspergillopepsina que al igual que taka amilasa A habían sido previamente descrita por Zhu (Zhu *et al.*, 2005) en cultivos con glucosa. Esto es indicativo de que algunas proteínas son producidas independientemente del medio de cultivo y que podrían cumplir funciones vitales para el crecimiento del hongo.

La proteómica de hongos ha tenido giros diversos, uno de ellos fue la tendencia a centrar la investigación en el análisis de la expresión diferencial de proteínas durante interacciones biológicas. Estas interacciones son abundantes en la naturaleza entre organismos de diferentes ecosistemas, y pueden darse también entre hongos y otros organismos. Schneider *et al.* (2010) estudiaron la respuesta biológica de la degradación de hojarasca por el ascomiceto *Aspergillus nidulans*, observando la variación cinética de la actividad enzimática de proteasas, celulasas y pectinasas, así como el crecimiento celular comparado entre cultivos independientes y en interacción con la bacteria mesófila gram-negativa *Pectobacterium carotovorum*. En primer lugar identificaron que el crecimiento de *A. nidulans* fue menor en presencia de *P. carotovorum*, mientras que *P. carotovorum* creció mejor en presencia de *A. nidulans*. Dado que crece más rápido y es incapaz de secretar muchas de las enzimas, se identificó que *P. carotovorum* crece a costa de *A. nidulans* como lo revelaron los

patrones de actividad proteolítica, celulolítica y pectinolítica, dándonos un ejemplo más de comportamiento engañoso en la naturaleza, puesto que *P. carotovorum* obtiene ventajas para su crecimiento sin pagar ningún precio.

Otros estudios sobre la proteómica de *Aspergillus* se han enfocado en identificar los cambios que se reflejan en el patrón de proteínas por efecto de diferentes fuentes de carbono. Han *et al.* (2010) analizaron el proteoma de *Aspergillus terreus* cultivado en sacarosa, glucosa y almidón. Identificaron exitosamente 82 manchas a partir de geles 2-DE y nano-LC-MS/MS, 16 de estas proteínas fueron halladas exclusivamente en sacarosa, 3 en glucosa y ocho en almidón. Doce proteínas fueron comunes en al menos dos medios de cultivo; la mayoría tenían actividad proteolítica y glucósido-hidrolasa. Sin embargo, el hallazgo más interesante en este trabajo fue el descubrimiento de algunas enzimas polisacárido-hidrolasa en cultivos con sacarosa. Muchas enzimas glucosidasas están usualmente sujetas a represión por carbono en presencia de azúcares monoméricos como glucosa, que ejerce regulación sobre el promotor xlnR previamente descrito en *A. nidulans* y otros *Aspergilli* (Tamayo *et al.*, 2008). Entonces, hallar glucosidasas en un medio con sacarosa, no es nada anormal, pero encontrar precursores de endo-1,4- β -xilanasa y 1,5- α -L-arabinosidasa A, es poco probable debido a que este tipo de proteínas son reprimidas en presencia de glucosa (van Peij, 1999). Por otra parte, Lu

et al. (2010) cultivaron *Aspergillus niger* en medio definido con xilosa o maltosa como fuente de carbono y observaron que en los medios con xilosa, las proteínas extracelulares identificadas fueron xilanasas, β -xilosidasas, arabinofuranosidasas, arabino furanohidrolasas, endoglucanasas, β -glucosidasa, glucoamilasa, α -galactosidasa, feruloil esterasa, glucanosil transferasa y quitinasas incluso cuando algunas de estas enzimas pueden estar reguladas por represión por carbono que se efectúa también en presencia de xilosa. En los cultivos con maltosa por otra parte, las proteínas que fueron identificadas corresponden mayoritariamente a glucoamilasas halladas en manchas de geles 2 DE en diferentes posiciones, indicando que es posible que se trate de isoenzimas. Así mismo, las proteínas normalmente reguladas por el gen XlnR como xilanasa A, xilanasa B o feruloil esterasa estuvieron totalmente ausentes, dando evidencia de cada fuente de carbono estimulan al hongo a echar a andar mecanismos diferentes para su asimilación.

Para identificar la presencia de enzimas con actividad glucósido hidrolasa como las arriba mencionadas Kim *et al.* (2007) propusieron una estrategia para identificar enzimas con actividad β -glucosidasa directamente sobre geles 2-DE, utilizando sustratos fluorescentes como 4-metilumbeliferil- β -D-glucósido, a partir de cultivos de *A. nidulans*. El uso de sustratos fluorescentes no es tan novedoso, puesto que este tipo de sustratos fueron usados varios años atrás con el mismo propósito

(van Tielburgh *et al.*, 1982). No obstante, el aspecto más innovador fue su aplicación en 2-DE, puesto que recuperar la actividad enzimática después del tratamiento desnaturalizante, con altas concentraciones de urea, que rompe las interacciones entre proteínas o el uso de ditiotreitól y detergentes como CHAPS hace prácticamente imposible la renaturalización de las proteínas. Además, la selección de la especie de estudio: *A. fumigatus* es *per se* novedoso, ya que la mayor parte de las investigaciones que se realizan con esta especie tienen aplicaciones clínicas.

Buena parte del trabajo realizado en el campo de la proteómica involucra técnicas de separación de proteínas por electroforesis en dos dimensiones con análisis de secuencias por huella digital de péptidos, MALDI-TOF u otros arreglos de espectrometría de masas. Sin embargo, con el fin de mejorar la identificación de péptidos fueron implementados con bastante éxito, nuevos métodos de separación de proteínas. Sin embargo, el creciente aumento en el número de estudios de proteómica se debe no solo a la mejora de las técnicas analíticas, sino que va de la mano de las nuevas tecnologías como la bioinformática, que también ha respaldado los estudios en genómica, permitiendo la predicción de proteínas no descritas previamente y cuya presencia ha sido comprobada posteriormente utilizando la proteómica. Braaksma *et al.* (2010) realizaron la predicción *in silico* de proteínas de secreción en cultivos de *A. niger* y posteriormente compararon sus

predicciones con las secuencias de proteínas que obtuvieron por análisis en “shotgun”, un tipo de secuenciación que emplea cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas no requiere una separación previa por 2-DE. Al comparar las proteínas que hallaron en cultivos con sorbitol y ácido galacturónico, observaron que la mayoría de las proteínas con conocida acción sobre carbohidratos se encontraban con ambas fuentes de carbono y con ayuda de información del transcriptoma de *A. niger* en ambas condiciones, observaron que el sistema pectinolítico era fuertemente inducido en presencia de ácido galacturónico. Por otra parte, las secuencias de péptidos identificados como proteínas hipotéticas sin homología previamente descrita en otras especies pudieron ser predichas solo en un 85% de los casos, evidenciando que aunque su propuesta de predicción puede ser muy acertada, está sujeta a la existencia de secuencias de gen y las anotaciones previamente realizadas para una secuencia particular.

En los últimos 10 años, se ha publicado un número considerable de trabajos relativos al proteoma de *Aspergillus*, sin embargo, un porcentaje muy elevado está dirigido solamente al estudio de *A. fumigatus* debido en gran medida a la trascendencia que posee la identificación de sus proteínas en el área médica, por lo que una breve reseña de la investigación que se ha realizado sobre su proteoma merece una mención aparte.

A. fumigatus es un conocido agente infeccioso de gran relevancia en el campo de la medicina. Al igual que otros hongos, es capaz de establecer contacto con su hospedero mediante sus conidias, causando daños principalmente en pacientes inmunodeprimidos, por lo que entender sus mecanismos de invasión y virulencia es un asunto de gran importancia. Asif *et al.* (2005) realizaron el análisis de proteínas superficiales de conidias de *A. fumigatus*, para identificar algunas de las proteínas que están directamente relacionadas con su invasión y virulencia. De acuerdo con los modelos clásicos de inmunología, para que las células T- intervengan en la reacción inmune, los macrófagos deben primero envolver al agente infeccioso y entonces liberar un péptido antígeno vía moléculas tipo MHCII a las células T con receptores específicos y así algunas proteínas de la superficie conidial podrían ser candidatas a antígenos de vacunas. En total lograron identificar 26 proteínas de superficie conidial, pero la más importante fue la hidrofobina Hyp1. Además de la hidrofobina, el resto de las proteínas halladas fueron lipasa, disulfuro isomerasa, y endopeptidasa. Concluyeron que tanto la lipasa como disulfuro isomerasa pudieran jugar un rol importante en el proceso invasivo debido a que son capaces de inducir daños celulares para facilitar la adherencia de las conidias, así como intervenir en los mecanismos de plegamiento de proteínas antígeno/alergeno de *A. fumigatus*. Otros estudios importantes son los trabajos realizados por Kniemeyer *et*

al. (2008) en el que realizaron la búsqueda de proteínas características de los procesos infecciosos de *A. fumigatus*, también el trabajo de Vödischet *al.* (2009) en el cual construyeron un mapa proteómico de las proteínas intracelulares y mitocondriales de *A. fumigatus* a partir de cultivos con glucosa, o el trabajo de Wartenberg *et al.* (2011) en el que demuestran que la proteína con mayor nivel de secreción es la Asp-hemolisina, que se produce independientemente del medio de cultivo aunque no sea una proteína relacionada directamente con la virulencia de la cepa. Más trabajos en la misma línea, incluyen el análisis de proteínas involucradas con la respuesta del hongo al choque térmico (Albretch *et al.*, 2010) y la identificación de factores de virulencia útiles como marcadores moleculares para la identificación de los procesos de infección (Kumar *et al.*, 2011).

Subproteoma y proteoma intracelular

Mientras algunas de las investigaciones sobre el proteoma se concentran en el estudio de las proteínas de secreción, otros se especializan en el estudio de proteínas intracelulares, estableciendo la relación que la presencia de éstas proteínas tiene con el desarrollo de diversas enfermedades, la patogenicidad de cepas y la respuesta a fármacos o a variables ambientales. En algunos casos, estos estudios deben ser más específicos, centrándose en las proteínas que forman parte de estructuras subcelulares, estudios que se denominan subproteomas. Un ejemplo de subproteoma

de *Aspergillus* fue obtenido por Bruneau *et al.* (2001). Ellos buscaron proteínas unidas a residuos de glicosilfosfatidil-inositol y que tienen como función la síntesis de pared celular, así como la incorporación de β 1-6 glucano a la misma, fenómeno asociado con la elongación del micelio, floculación y adhesión a superficies. Utilizando una ingeniosa combinación de hidrólisis enzimática, anticuerpos policlonales, 2-DE y espectrometría de masas, compararon las secuencias de proteínas de *A. fumigatus* con el genoma de *S. cerevisiae*, puesto que el genoma del primero no fue publicado sino hasta 2005 (Nierman *et al.*, 2005). Así, hallaron que seis proteínas tenían una función predicha como β -1,3-glucanosiltransferasa, fosfatasa, fosfolipasa y β -1,3 o β -1-4 glucanasa.

Al año siguiente, Melin *et al.* (2002), publicaron el proteoma de *A. nidulans* asociado con la respuesta a la presencia de concanamicina A. En primer lugar, observaron cambios en la morfología del micelio acompañado por diferencias en los patrones de proteína 2-DE que se asociaron con la presencia del antibiótico, así como la regulación positiva y negativa de algunas proteínas. Las proteínas desreguladas (regulación negativa) fueron identificadas gracias a su semejanza con dos proteínas previamente descritas en *A. nidulans*. Una de estas proteínas está relacionada con el control global síntesis de aminoácidos, y la diferenciación sexual del hongo. La otra, fue identificada como gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, una importante enzima de la glucólisis. Las secuencias de

las proteínas con regulación positiva no fueron claramente asociadas con ninguna otra existente en bases de datos, por lo que la limitada información existente hasta ese momento fue el principal obstáculo para la plena identificación de tales proteínas. A pesar de esto, se identificaron como proteínas parecidas a otras inducidas por cadmio previamente descritas en *Candida* sp.

Ström *et al.* (2005) realizaron cultivos mixtos de *A. nidulans* y *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 para evaluar el efecto del cultivo mixto en el crecimiento del hongo. Adicionalmente, probaron el crecimiento de *A. nidulans* en presencia de ácido láctico, ácido 3-fenil láctico y ciclo (L-Phe-L-Pro) sustancias con conocido efecto anti fúngico y que son producidas por *L. plantarum*. Además de encontrar diferencias en la morfología de *A. nidulans* durante el crecimiento, observaron el cambio de cinco proteínas específicas en los patrones de proteína obtenidos, no solo por la intensidad de las manchas en los análisis de 2-DE, sino por la posición que ocupaban. Cuando estas manchas fueron secuenciadas, encontraron que tres de cinco proteínas tenían la misma secuencia, y las dos restantes eran semejantes entre ellas, incluso cuando tenían posiciones diferentes de acuerdo con su punto isoelectrico y peso molecular. Esas proteínas fueron denominadas Lbu A y Lbs A y ambas tenían regulación positiva en el cultivo mixto en presencia de las tres sustancias, y una de ellas, la Lbs A mostró un elevado grado de

similitud con la proteína anotada NADH-ubiquinona oxidoreductasa.

Kniemeyer *et al.*, (2006) publicaron la optimización de un protocolo 2DE para proteínas intracelulares de *A. fumigatus*, en el que tras romper el micelio, precipitaron la proteína recuperada probando dos métodos: el producto comercial "2D-Clean Up (GE Health care life sciences) y precipitación con TCA/acetona. Probaron también diferentes buffers de lisis en donde modificaron la concentración de Urea, tiourea y CHAPS. Compararon los patrones obtenidos con los diferentes métodos sin encontrar diferencias importantes en los geles 2D, pero la cantidad de proteína recuperada con TCA/acetona era superior al doble de la que obtenían con el producto comercial de lisis. Encontraron que incluso cuando el número e intensidad de las manchas halladas con el tratamiento con Clean up fue mayor que usando buffer de lisis, SDS/2D clean up y TCA/acetona, la definición de manchas fue mayor con TCA/acetona. Aun así asumieron que los patrones resultantes fueron similares. Por otra parte, cuando compararon la efectividad de los cinco buffers de lisis, hallaron que el buffer con 7 M Urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 0.8% anfolitas, 20 mM DTT y 20 mM Tris dio los mejores resultados. También probaron dos fuentes de carbono distintas para buscar diferencias en los patrones de proteína y el efecto de la represión por carbono, hallando que en presencia de etanol *A. fumigatus* presentaba un fuerte efecto de regulación positiva sobre las enzimas necesarias en el ciclo del glioxilato, gluconeogénesis y

oxidación de etanol, mientras que en presencia de glucosa, un menor número de proteínas mostraban un incremento importante. No fue sorprendente encontrar que las enzimas de la ruta glucolítica fueran reguladas positivamente.

Kimet *al.* (2007) obtuvieron el proteoma que *A. nidulans* genera en respuesta a la osmoadaptación en un cultivo con KCl. Identificaron un total de 30 proteínas utilizando huella digital de péptidos y encontraron que la mayoría de estas proteínas estaban involucradas en la ruta glucolítica, lo que resultaba congruente con los resultados hallados también en estudios proteómicos realizados previamente en *Arabidopsis*, *S. cerevisiae* y otros organismos. Una de las proteínas más importantes durante su estudio fue identificada como Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GDP), una enzima clave en la glucolisis, pero que también está involucrada en la apoptosis y la respuesta al estrés oxidativo.

Por otra parte, Shimizu *et al.* (2009) obtuvieron el mapa proteómico comparativo de *A. nidulans* en condiciones normales de oxigenación y bajo hipoxia. Lograron identificar un total de 332 proteínas, las cuales pertenecen a las principales vías metabólicas como gluconeogénesis, y el ciclo del glioxalato. En condiciones de hipoxia, las proteínas pertenecientes a tales vías regulan negativamente su expresión y por el contrario la ruta de pentosas fosfato se veía favorecida bajo estas mismas condiciones.

En 2011 fue publicado un trabajo (Crespo *et al.*, 2011) en el que se utilizaron herramientas de proteómica y PCR en tiempo real, para identificar las proteínas que a manera de marcadores moleculares están involucradas en la síntesis de ocratoxina de *Aspergillus carbonarius*. Apoyándose en el genoma de *A. niger* para comparar las secuencias que obtuvieron, identificaron siete proteínas sobre expresadas durante la producción de ocratoxina: una hidrolasa, una aminotransferasa, CipC ubiquinona reductasa, peroxirredoxina mitocondrial, una proteína acoB y otra relacionada con un factor de iniciación de la traducción, mientras que dos proteínas eran sub expresadas. En conjunto, las proteínas identificadas forman parte de mecanismos de regulación, metabolismo de aminoácidos, estrés oxidativo y esporulación.

Integración de la información

Algunos de los estudios más recientes realizados en el campo de la proteómica están dirigidos a integrar la información generada por el genoma, transcriptoma y proteoma. Una ventaja importante es la disponibilidad que actualmente tienen las secuencias de algunos *Aspergilli* como *A. oryzae* (Machida *et al.*, 2005), *A. nidulans* (Galagan *et al.*, 2005) y *A. fumigatus* (Nierman *et al.*, 2005). El trabajo de Albrecht *et al.* (2010) intenta ya relacionar la respuesta de *A. fumigatus* al choque térmico por medio de la comparación de su patrón de proteínas, las secuencias putativas de genes de *A. fumigatus* así como la

información de los transcritos obtenidos por medio de micro arreglos. A su vez, compararon la información experimental de micro arreglos con perfiles de expresión genética disponibles en bases de datos. Sus resultados fueron comparados con los de un hongo mesófilo termotolerante como *S. cerevisiae* hallando un total de 1886 manchas que fueron detectados en el cultivo a 48°C, pero solo 183 de ellas fueron analizadas. La función putativa para estas proteínas se dividió en las categorías: proteínas involucradas con el plegamiento de otras proteínas, organización del citoesqueleto, transcripción, traducción y respuesta a estrés oxidativo. Cincuenta y cuatro de estas parecen estar positivamente reguladas, mientras que solo 10 están desreguladas. Comparando la respuesta al choque térmico de *A. fumigatus* con la respuesta al mismo daño por parte de *S. cerevisiae* encontraron que no había un cambio importante entre los mecanismos echados a andar para la reparación de daños en ambos sistemas biológicos. Finalmente, cuando realizaron la comparación global entre el transcriptoma, proteoma y genoma, encontraron que no era posible establecer una relación clara entre genoma y transcriptoma, puesto que solo 32 transcritos se hallaron diferencialmente regulados en ambos casos. Aunque la comparación del proteoma y transcriptoma mostró también una baja correlación entre muchos de los transcritos y las proteínas asociadas, es un fenómeno que posee explicaciones diferentes, sin que por esto pueda ser asumida totalmente

alguna de ellas. Todo esto sin duda corresponde a un esfuerzo importante por integrar el trabajo de tres enfoques moleculares distintos partiendo de las evidencias experimentales obtenidas.

Trabajos recientes plantean un nuevo rumbo en la investigación: el uso de herramientas informáticas de predicción. Chang *et al.* (2009) publicaron un trabajo en el que usando las secuencias generadas en la construcción del genoma de *A. flavus* hicieron computacionalmente la predicción de múltiples sitios de edición del RNA que se genera durante la transcripción. Construyeron así una base de datos con los sitios de edición y una lista de posibles isoformas de proteína que fueron posteriormente comparadas con la lista de espectros de masas generados durante el análisis SILAC de proteínas previamente obtenidas a partir de cultivos de *A. flavus* (Georgianna *et al.*, 2008). El resultado fue la generación de 9,807 nuevas secuencias adicionales a las 12,832 proteínas anotadas para *A. flavus* que no consideraba la presencia de isoformas, así como 29 nuevas proteínas identificadas con la base de datos construida y validados por medio de la construcción de péptidos sintéticos como evidencia del éxito del método. Sin embargo, publicaciones recientes omiten la demostración experimental, apoyándose únicamente en la información disponible en las bases de datos, generando rutinas de predicción de sitios de edición específicos para ciertos organismos. Wang *et al.* (2009) crearon NetAspGene, una herramienta informática que se encuentra disponible

públicamente y que fue construida utilizando la secuencia del genoma de *A. fumigatus* como modelo. Esta herramienta a su vez les permitió realizar la comparación del genoma de cuatro especies del género *Aspergillus*. Los genomas de *A. nidulans*, *A. oryzae* y *A. niger*, que también son públicos desde varios años les permitieron buscar sitios consenso de reconocimiento para la edición de RNA. A diferencia de los programas de búsqueda de genes, que típicamente rastrean sitios de inicio y terminación de codones por par, el programa que crearon busca independientemente múltiples secuencias de inicio de edición, así como múltiples secuencias de fin de edición y las combina para formar una infinidad de secuencias de RNA codificantes. No obstante, como este existen también el FSPLICE y GeneID que son programas de predicción para la identificación de sitios de edición en secuencias específicas de *Aspergillus*, y como programas de predicción generales existen también HMMgene, NetGene2, HSPL, NNSPLICE, Splice View y GeneID-3 (Thanaraj *et al.*, 2000).

La era de la bioinformática

El auge de la genómica en los años 90 y su acelerada expansión generó una necesidad no contemplada hasta entonces: la creación de bases de datos que permitieran almacenar grandes cantidades de información y que a su vez, fueran de dominio público. Así, NCBI, EMBL-EBI y Protein DataBank (PDB) se convirtieron en las principales bases de datos de libre

acceso. No obstante el aumento en la generación masiva de secuencias de genes y proteínas demandaba la creación de sitios que pudieran almacenar más información, pero también más específica de las secuencias codificantes para organismos particulares. Sitios como Eurofung, Fungal Secretome Database (Choi *et al.*, 2010), CADRE (Mabey *et al.*, 2004) y FunSeckB (Lumet *et al.*, 2011) nacieron con el propósito de almacenar secuencias pertenecientes exclusivamente a hongos, mientras que sitios como CAZy (Cantarel *et al.*, 2009) se especializan en almacenar secuencias de enzimas glucósido hidrolasas de diferentes organismos y se encuentra en continua revisión, gracias a la curación constante de las secuencias que ahí están disponibles (Murphy *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

Los estudios proteómicos de *Aspergilli* han tenido un desarrollo importante durante los últimos años desde el establecimiento de protocolos de trabajo y la mejora de las técnicas de separación, al creciente y cada vez más necesario análisis de secuencias apoyadas en el uso de bases de datos. Aún hace falta más, pues es necesario ampliar el horizonte hacia otros miembros del género, ya que en su mayoría las investigaciones se han centrado en el estudio de especies como *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*, *A. nidulans* y *A. terreus*, pero no incluye a otras especies menos populares como *A. carbonarius*, *Aspergillus nigricans*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus flavipes* y

muchas otras, que sin duda poseen un gran potencial de estudio. La limitada información, que sobre estos organismos, particularmente de estas últimas especies, se halla en bases de datos, restringen aún más el margen de trabajo. Por ello es necesario el desarrollo de estudios proteómicos de diferentes especies, incluso si no existen las bases de datos necesarias, pues es posible interpretar información extrapolando la de otros organismos, solo de esta manera será posible incrementar el acervo y hacer que miremos más allá, hacia profundizar el conocimiento de especies con gran potencial.

REFERENCIAS

- Albrecht D, Guthke R, Brahage A & Kniemeyer O (2010) Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. *BMC genomics* 11: 32.
- Angel T, Jacons J, Spudich S, Gritsenko M, Fuchs D, Liegler T, Zetterberg H, Camp D. Price R & Smith R (2012) The cerebrospinal fluid proteome in HIV infection: change associated with disease severity. *Clin. Proteom.* 9: 3.
- Asif A, Oellerich M, Armstrong V, Riemenschneider B, Monod M & Reichard U (2005) Proteome of conidial surface associated proteins of *Aspergillus fumigatus* reflecting potential vaccine candidates and allergens. *J Prot Res* 5: 954-962.
- Bennett J (1998) Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *J. Biotech.* 66: 101-107.
- Bieseke R, Boussier A, van Biezen N, van

- van den Hondel C & Punt P (2006) Identification of secreted proteins of *Aspergillus oryzae* associated with growth on solid cereal substrates. *J. Biotech.* 121: 482-485
- Braaksma M, Uzunova E, Punt P & Schaap P (2010) An inventory of the *in silico* predictions with shotgun proteomics data. *BMC genomics.* 11:584
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Bruneau J, Magnin T, Tagat E, Legrand R, Bernard M, Diaquin M, Fudali C & Latgé JP (2001) Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. *Electrophoresis* 22: 2812-2823
- Bustanza F & Caballero A (1948) Obtención de rutina y quercetina y contribución al estudio de sus propiedades antibacterianas. *Anales del jardín Botánico de Madrid* 7: 549-559.
- Camacho N & Aguilar G (2003) Production, Purification and Characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus sp* and its application in baking. *Appl. Biochem. Biotech.* 104: 159-171.
- Cantarel B, Coutinho P, Rancurel C, Lombard T & Henrissat B (2009) The Carbohydrate- Active EnZymes database (CAZY): an expert resource for Glycogenomics. *Nucl. Acids Res.* 37: D233-D238.
- Carberry S & Doyle, S (2007) Proteomic studies in biomedically and industrially relevant fungi. *Cytotech.* 53: 95-100.
- Chaerkady R, Pandey A (2008) Applications of Proteomics to Lab Diagnosis. *Ann. Rev. Path.* 3: 485-498
- Chan LL, Chun LLS, Hodgkiss IJ (2002) Proteomic study of a model causative agent of harmful red tide, *Procentrum triestinum* 1: Optimization of sample preparation methodologies for analyzing with two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2: 1169-1186
- Choi J, Park J, Kim D, Jung K, Kang S & Lee,Y (2010) Fungal Secretome Database: Integrated platform for annotated of fungal secretomes. *BMC Genomics*, 11: 105
- Compton, S. & Jones, C (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford Protein assay. *Anal. Biochem.* 151: 369-374
- Crespo A, Gil J & Martínez P (2011) Proteome analysis of the fungus *Aspergillus carbonarius* under ochratoxin A producing conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 147: 162-169.
- Encarnación S, Hernández M, Martínez G, Contreras S, Vargas M & Mora J (2005) Comparative proteomics using 2D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes. *Biol. Proced.* 7: 117-135.
- Fragner D, Zomorodi M, Kües U &

- Majcherczyk A (2009) Optimized protocol for the 2-DE of extracellular proteins from higher basidiomycetes inhabiting lignocellulose. *Electrophoresis*. 30: 2431-2441
- Galagan J & Calvo S (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438: 105-1115
- García-Arellano H. & Vazquez-Duhalt R (1998) Cuantificación de proteínas. Una revisión. *BioTecnología*. 3: 78-87.
- Georgianna D, Hawkridge A, Muddiman D & Payne G (2008) Temperature-dependent regulation of proteins in *Aspergillus flavus* whole organism stable isotope labeling by amino acids. *J. Prot. Res.* 7: 2973-2979.
- Glazer A (2007) Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology. Cambridge University Press 2nd ed. United Kingdom
- Görg A, Obermaier Ch, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R & Weis W (2000) The current state of two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 21: 1037-1053.
- Grinyer J, Kautto L, Traini M, Willows R, Te'o J, Bergquist P & Nevalainen H (2007) Proteome mapping of the *Trichoderma reesei* 20S proteasome. *Curr. Gen.* 51: 79-88
- Grinyer J, McKay M, Herbert B & Nevalainen H (2004) Fungal proteomics: mapping the mitochondrial proteins of a *Trichoderma harzarium* strain applied for biological control. *Curr. Gen.* 45: 170-175
- Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH & Aebersold R (1999) Quantitative analysis of protein complex protein mixtures using isotope coded affinity tags. *Nature Biotech.* 17: 994-999
- Han M, Kim N, Lee S & Chang H (2010) Extracellular proteome of *Aspergillus terreus* grown on different carbon sources. *Curr. Genet.* 56: 369-382
- Hekmat O, Florizone Ch, Kim Y, Eltis L, Warren R & Withers S (2007) Specificity Fingerprinting of retaining α -1,4-glycanases in the *Cellulomonas fimi* secretome using two fluorescent mechanisms-based probes. *Chem. Biochem.* 8: 2125-2132
- Hekmat, O, He S, Warren R & Withers S (2008) A mechanism based ICAT strategy for comparing relative expression and activity levels of glycosidases in biological systems. *J. Proteome Res.* 7: 3282-3292
- Kim K, Brown K, Harris P, Langston J & Cherry J (2007) A proteomics strategy to discover α -glucosidases from *Aspergillus fumigatus* with two-dimensional page in-gel activity assay and tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 6: 4749-4757
- Kim Y, Nandakumar M & Marten M (2007) Proteome map of *Aspergillus nidulans* during osmoadaptation. *Fung. Gen. Biol.* 44: 886-895
- Klein J & Thongboonkerd V (2004) Overview of Proteomics. *Contrib. Nephrol. Basel Karger* 141: 1-10
- Kniemeyer O, Lessing F & Brakhage A (2009) Proteome analysis for

- pathogenicity and new diagnostic markers for *Aspergillus fumigatus*. *Med. Myc.* 47 Suppl 1: S248-54.
- Kniemeyer O, Lessing F, Scheiner O, Hertweck Ch & Brakhage A (2006) Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Gen.* 49: 178-189
- Kumar A, Ahmed R, Singh P & Shukla P (2011) Identification of virulence factors and diagnostic markers using immunosecretome of *Aspergillus fumigatus*. *J. Prot.* 74: 1104-1112
- Liang Y, Pan L & Lin Y (2009) Analysis of extracellular proteins of *Aspergillus oryzae* grown on soy sauce Koji. *Biosc. Biotech. Biochem.* 73: 192-195.
- Lilburn T, Cai H, Zhou Z, Wang Y (2010) Protease-associated cellular networks in malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics* 12:S9
- Lowry O, Rosebrough, N., Farr, L. & Randall, R (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 75: 193-265.
- Lu X, Nimtz M, Wissing J, Zeng A & Rinas U (2010) The intra and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. *Microb. Cell. Fact.* 9: 23
- Lum G & Min X (2011) FunSeckB: the Fungal Secretome Knowledge Base. DATABASE, 2011: bar001
- Mabey J, Anderson M, Giles P, Miller C, Attwood T, Paton N, Bornberg E, Robson G, Oliver S & Denning D (2004) CADRE: the Central *Aspergillus* Data Repository. *Nucl. Acid. Res.* 32: D401-D405.
- Machida M & Asai K (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438: 1157-1161.
- Mann M, Hendrickson R & Pandey A (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 437-473.
- Medina M, Haynes P, Brei L & Francisco W (2005) Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Proteome.* 5: 3153-3161
- Medina M, Kiernan U. & Francisco W (2004) Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Fung. Gen. Biol.* 41: 327-335
- Melin P, Schnürer J & Wagner E (2002) Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* proteins associated with the response to the antibiotic concanamycin A, produced by *Streptomyces* species. *Molec. Gen. Genom.* 267: 695-702
- Murphy C, Powlowski J, Wu M, Butler G & Tsang A (2011) Curation of characterized glycoside hydrolases of Fungal origin. DATABASE, 2011: bar020
- Nandakumar M & Marten M (2002) Comparison of lysis methods and preparation protocols for one and two dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins. *Electrophoresis.* 23: 2216-2222.
- Nandakumar M, Shen J, Raman B & Marten M (2003) Solubilization of Trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two dimensional electrophoresis. *J. Prot. Res.* 2: 89-93.

- Nguyen C, Tsurumitsu R, Sato T & Takeuchi M (2005) Taka amylase A in the conidia of *Aspergillus oryzae* RIB40. *Biosc. Biotech. Biochem.* 69: 2035-2041.
- Nielsen F, Morgensen J, Johansen M, Larsen T & Frisvad J (2009) Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Anal. Bioanal. Chem.* 395: 1225-1242
- Nierman W. & Pain A (2005) Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 428: 1151-1156.
- O'Farrell P (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021
- Oda K, Kakizono D, Yamada O, Iefuji H, Akita O & Iwashita K (2006) Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3448-3457
- Okutucu B, Dinçer A, Habib Ö & Zihmoglu F (2007) Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 70: 709-711
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen D, Steen H, Pandey A & Mann M (2002) Stable isotope labeling by amino acid in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell Proteomics.* 1: 376-386.
- Pandey A & Mann M (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405: 837-846.
- Payne G, Nierman W, Wortman J, Pritchard B, Brown D, Dean R, Bhatnagar D, Cleveland T, Machida M & Yu J (2006) Whole Genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. *Med. Mycol.* 44: 9-11,
- Polizeli M, Rizzatti A, Monti R, Terenzi H, Jorge JA & Amorim D (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *App. Microb. Technol.* 67: 577-591.
- Ritorto MS, Borlak J (2011) Combined serum and tissue proteomic study applied to a c-Myc transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma identified novel disease regulated proteins suitable for diagnosis and therapeutic intervention strategies. *J. Proteome Res.* 12: 3012-3030
- Shimizu M, Fujii T, Masuo S, Fujita K & Takaya N (2009) Proteomic analysis of *Aspergillus nidulans* cultured under hypoxic conditions. *Proteome.* 9: 7-19.
- Shneider T, Gerrits B, Gassmann R, Schmid E, Gessner M, Richter A, Battin T, Eberl L & Riedel Kathrin (2010) Proteome analysis of fungal and bacterial involvement in leaf litter decomposition. *Proteome.* 10: 1819-1830
- Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M, Fujimoto E, Goeke N, Olson B & Klenk D (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Song X, Bandow J, Sherman J, Baker D, Brown P, McDowell M & Molloy M (2008) iTRAQ experimental design for

- plasma biomarker discovery. *J. Prot. Res.* 7: 2952-2958.
- Ström K, Schürer J & Melin P (2005) Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. *FEMS Microb. Lett.* 246: 119-124
- Tamayo E, Villanueva A, Hasper A, Graaff L, Ramón D & Orejas M (2008) CreA mediates repression of the regulatory gene *xlnR* which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Fung. Gen. Biol.* 45: 984-993
- Tekaia F, Latgé JP (2005) *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr. Op. Microbiol.* 8: 385-392
- Thanaraj T (2000) Positional characterization of false positives from computational prediction of human splice sites. *Nucl. Acid. Res.* 28: 744-754.
- Thomas C, Ehrhardt A & Kay M (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Rev. Gen.* 4: 346-358.
- Van Peij N (1999) Transcriptional regulation of *Aspergillus* involved in xylan and pectin degradation. Ph thesis. Wageningen Agriculture University Netherland
- van Tilbeurgh H, Clayssens M & Bruyne C (1982) The use of 4-methylumbelliferyl and other chromophoric glycosides in the study of cellulolytic enzymes. *FEBS Lett.* 149: 152-156.
- Vödisch M, Albretch A, Lebing F, Schimdt A, Winkler R, Guthke R, Brakhage A & Kniemeyer O (2009) Two dimensional reference maps for the human pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Proteome.* 9: 1407-1415.
- Wang K, Ussery DW & Brunak S (2009) Analysis and prediction of gene splice sites in four *Aspergillus* genomes. *Fung. Gen. Biol.* 46: S14-S18.
- Wartenberg D, Lapp K, Jacobsen I, Martin H, Kniemeyer O, Heinekamp T & Brakhage A (2011) Secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* reveals Asp-hemolysin as a mayor secreted protein. *Int. J. Med. Microbiol.* 301: 602- 611.
- Washburn M, Wolters D & Yates, J (2001) Large scale analysis of the yeast proteome by Multidimensional Protein Identification Technology. *Nature Biotech.* 19: 242-247
- Witteveen C & Visser, J (1995) Polyol pools in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.* 134: 57-62.
- www.ebi.ac.uk/; www.ncbi.nlm.nih.gov/;
www.wwpdb.org/; www.eurofung.net/
- Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, Lan N. Jansen R, Bidlingmaier S, Houfek T, Mitchell T, Miller P, Dean RA, Gerstein M & Snyder M (2001) Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 293: 2101-2105
- Zhu L, Nguyen C, Sato T & Takeuchi M (2004) Analysis of secreted proteins during conidial germination of *Aspergillus oryzae* RIB40. *Biosc. Biotech. Biochem.* 68: 2607-2612



www.smbb.com.mx