

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

Año 2024 Volumen 28, Número 3
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biología y Bioingeniería



MESA DIRECTIVA

2024 – 2026

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
Presidente

Dr. Francisco José Fernández Perrino
Vicepresidente

Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez
Secretario

Dra. Neith Aracely Pacheco López
Tesorero

Dra. Andrea Sabido Ramos
Subsecretario

Dra. Carolina Peña Montes
Subtesorero

M.C. Oscar Ulises García Flores
Vocal estudiante

EDITORIA

Dra. María Soledad Córdova Aguilar
UNAM

Co-editor

Dr. Jorge Gracida
UAQ

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Aurora Antonio Pérez
Dra. Isadora Martínez Arellano
Dra. Andrea Sabido Ramos
Dra. Georgina Sandoval
Dra. Elda Patricia Segura Ceniceros
Dra. María Eugenia de la Torre
Dra. Virginia Villacruz
Dra. Beatriz Ruiz Villafán

Formación y edición

Pas. QA Mariana Espinoza Tapia

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), en LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal), los artículos se encuentran en Google Académico. 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, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México. o a la siguiente dirección electrónica revista_biotecnologia@smbb.mx.

Índice

Instrucciones para los autores 4

Artículos

La promiscuidad catalítica de CaLB y su potencial en síntesis orgánica

Guadalupe J. Santoyo-Canchola y José D. Rivera-Ramírez 8

Mejora en el manejo de residuos orgánicos desde una planta de bivalvos *Mytilus chilensis* para su directa disposición en suelos Catálisis de residuos orgánicos

Diego Bustos, Pamela Olivares-Ferreti, Viviana Chavez, Hector Herrera y Jorge Parodi 23

Correlación de variables operativas y nutrientes del medio de cultivo en la biodegradación de plumas de pollo

Roberto González-Reyes, Maribel Quezada-Cruz, Maribel Baltazar-Quezada, Samuel García-Hernández 36

Identificación molecular de aislados de *Anaplasma marginale* en México mediante el gen *msp1a*

Elizabeth Salinas Estrella, Mayra Elizeth Cobaxin Cárdenas, Alex Sebastian Hernández Álvaro, Itzel Amaro Estrada, Jesús Francisco Preciado de la Torre, Sergio D. Rodríguez Camarillo 52

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 en los que se puede publicar en 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.

Para evitar errores innecesarios se recomienda usar el corrector de gramática y ortografía del procesador de palabras. 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 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), ADN, ARN 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 aspectos fundamentales hasta sus aplicaciones, incluyendo: Enzimas y Biocatálisis, Microbiología, Biotecnología Agrícola y Vegetal, Biotecnología Marina, Alimentos y bebidas, Biotecnología farmacéutica, Biotecnología Ambiental, Bioingeniería y fermentaciones, Bioenergía y biocombustibles, Biología de sistemas y bioinformática, Biología sintética, Nanobiotecnología y biomateriales, Ingeniería metabólica, Omicas, Bioseguridad y Bioética.

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

1. El título del manuscrito se escribirá en negritas con letra Arial o equivalente tamaño 14. El título deberá estar centrado y ser conciso e informativo. Evite el uso de abreviaciones y fórmulas.

Instrucciones para los autores

2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño 12. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como la dirección de correo del autor corresponsal. Si el responsable fuera un estudiante, deberá incluir una carta del tutor o director del trabajo autorizándolo.
3. Se deberá añadir un Resumen de no más de 250 palabras en español y el correspondiente Abstract en inglés.
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 de 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.
7. 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 y al igual que las figuras, al final del manuscrito.
8. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a la fuente de información original. 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 escribirá como sigue: “Gutiérrez et al. (2003), han demostrado...” O bien: “Datos recientes (Gutiérrez et al., 2003) han mostrado...”

Instrucciones para los autores

Si la cita es una página de Internet, la dirección URL deberá escribirse completa y entre paréntesis directamente en el texto.

9. La lista de Referencias se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño 10) y con sangría francesa de acuerdo con el siguiente formato:

Artículos:

Bayegan AH, Clote P (2020) RNAmountAlign: Efficient software for local, global, semiglobal pairwise and multiple RNA sequence/structure alignment. PLoS ONE 15(1): e0227177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227177>.

Libros:

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

Capítulos de libros:

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.

Patentes:

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

Congresos y reuniones:

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solis 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.

Instrucciones para los autores

Sitios en internet:

CAZY, Carbohydrate-Active Enzymes Database. (<http://www.cazy.org/>)

Tesis de pre y posgrado:

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la producción de safranal. Tesis Maestría 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.

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 se someten en línea en la página electrónica de la Sociedad Mexicana de Biotecnología, en la dirección <https://smbb.mx/publicaciones/publicacion-de-articulo/>. Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor correspondiente. La dirección para mantener comunicación con el editor es: revista_biotecnologia@smbb.mx y marisol.cordova@icat.unam.mx.

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 promiscuidad catalítica de CaLB y su potencial en síntesis orgánica

Guadalupe J. Santoyo-Canchola^{a,b}; José D. Rivera-Ramírez^{b*}

^a*Programa de Doctorado en Ciencias en Procesos Biotecnológicos. Departamento de Ingeniería Química, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino García Barragán 1421, Guadalajara, Jalisco, México 44430.*

^b*Laboratorio de Química Farmacéutica departamento de Farmacobiología, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino García Barragán 1421, Guadalajara, Jalisco, México 44430.*

**domingo.rivera@academicos.udg.mx*

Resumen

La lipasa CaLB es empleada actualmente en una amplia variedad de transformaciones orgánicas y condiciones de reacción que van desde sustituciones nucleofílicas en el acilo, adiciones tipo Michael y formación de enolatos, cada una con la posibilidad de operar a nivel de quimio-, regio- y estereoselectividad, en medios acuosos y no acuosos. Estos niveles de reactividad y tolerancia de condiciones tienen su origen en la capacidad de la enzima en reconocer grupos carbonilo y poder estabilizar los oxianiones y enolatos correspondientes a cada tipo de transformación, así como su estabilidad en disolventes y temperaturas superiores a las fisiológicas.

Palabras Claves: *CaLB, promiscuidad catalítica, síntesis orgánica, adición de Michael, reacciones no convencionales.*

Abstract

The CaLB lipase enzyme is currently utilized in a wide range of organic transformations and reaction conditions. These include nucleophilic acyl substitutions, Michael-type additions, and enolate formation, each offering the potential for chemo-, regio-, and stereoselectivity, and can operate in both aqueous and non-aqueous media. This versatility and ability to tolerate varying conditions stem from the enzyme's capacity to identify carbonyl groups and stabilize the oxyanions and enolates required for each type of transformation, as well as its stability in solvents and at temperatures higher than physiological ones.

Key Words: *CaLB, catalytic promiscuity, organic synthesis, Michael addition, unconventional reactions*

Introducción

La promiscuidad catalítica se observa cuando una enzima realiza transformaciones sobre sustratos orgánicos no naturales en medios acuosos o no acuosos. Con este concepto se ha podido explicar cómo las enzimas pueden tolerar y transformar diferentes grupos funcionales y sustratos. Esto no implica modificaciones en la naturaleza reactiva de la enzima (una técnica conocida como evolución dirigida de proteínas), sino que los sustratos o condiciones de reacción tolerados por una enzima “promiscua” aún satisfacen un rango específico de su capacidad catalítica como conectividad de grupos funcionales específicos, propiedades estereoeléctricas y/o naturaleza de los estados de transición (Choi et al., 2001; Dwivedee et al., 2018).

Una de las enzimas más útiles en la síntesis orgánica es la isoenzima B de la lipasa *Candida antarctica* (CaLB, nombrada recientemente como *Moesziomyces antarcticus*), que pertenece a la familia de las α/β -hidrolasas. Muchas lipasas se obtienen de levaduras como *Candida lipolítica*, *Candida antártica* y *Candida rugosa*; la más versátil se obtiene de la levadura *basidomycetus* de *Candida antártica* la cual se encontró en el suelo hipersalino del lago Vanda en la Antártida cuando se buscaban enzimas extremófilas para usarse en detergentes. Este organismo produce dos isoenzimas, la A y la B, las cuales difieren en cantidad de residuos. CaLA presenta activación interfacial, es Ca^{+2} -dependiente y más termoestable que CaLB. CaLA muestra poca promiscuidad catalítica, pero se ha reportado que es la única que puede resolver alcoholes terciarios impedidos estéricamente, mientras que CaLB es más útil en ésteres no naturales (Monteiro et al., 2021). NOVO® ofrece preparados de ambas enzimas las cuales se sobreexpresan en *Aspergillus oryzae* como organismo huésped. CaLB está constituida por 317 aminoácidos con una masa molecular de 33 KDa y un

plegamiento α,β -hidrolasa; es más rígida que otras lipasas y no presenta el fenómeno de activación interfacial, lo cual la hace un intermediario entre una lipasa y una esterasa, sin embargo se ha reportado que su sitio catalítico puede adoptar conformaciones de diferentes dimensiones, lo que provoca cierta selectividad de algunos sustratos (Ganjalkhany et al., 2012). Tiene un rango de desactivación de 50 a 60°C y hasta 80°C en formas inmovilizadas, además es resistente y activa en disolventes orgánicos y a diferentes actividades de agua (Tjørnelund et al., 2023).

La estructura del sitio activo de esta enzima fue elucidada por Uppenberg (1994, 1995), mide de 12 Å de profundidad y 10 Å de diámetro, aproximadamente. Este sitio se divide en regiones de acuerdo con su función en el reconocimiento de las características estructurales, reactivas o quirales de los sustratos (Figura 1). Así, en el fondo del hueco se encuentran la triada catalítica (**A**; Asp187, His224, Ser105) y el sitio oxianiónico (**B**; Gln106, Thr 40). Las regiones que contribuyen al acomodo de los dos sustratos son la región del acilo (**C**; Leu140, Leu144), donde los sustratos acilo acomodan su cadena lateral y la región del alcohol (**D**; Leu278), por donde entra el segundo sustrato para deacilar a la enzima. Esas dos regiones surgen paralelamente del fondo del sitio a la superficie y están separadas por dos cadenas hidrofóbicas (**E**; Ile189 e Ile285). Una cavidad pequeña (**F**; Trp104) da origen a la estereoselectividad; en la cual el sustituyente corto del enantiómero mejor reconocido se acopla bien; este residuo precede a la serina activa y forma un puente de hidrógeno desde el átomo de nitrógeno de su indol hasta el oxígeno de la histidina. El resto de los residuos son sitios hidrofóbicos que dan estructura al sitio catalítico (**G**; Val190, Val154, Asp134, Gln157; Ala141, Thr138, Ala151, Ser, 150, Ala287, Val286) (Błaszczyk & Kielbasiński, 2020).

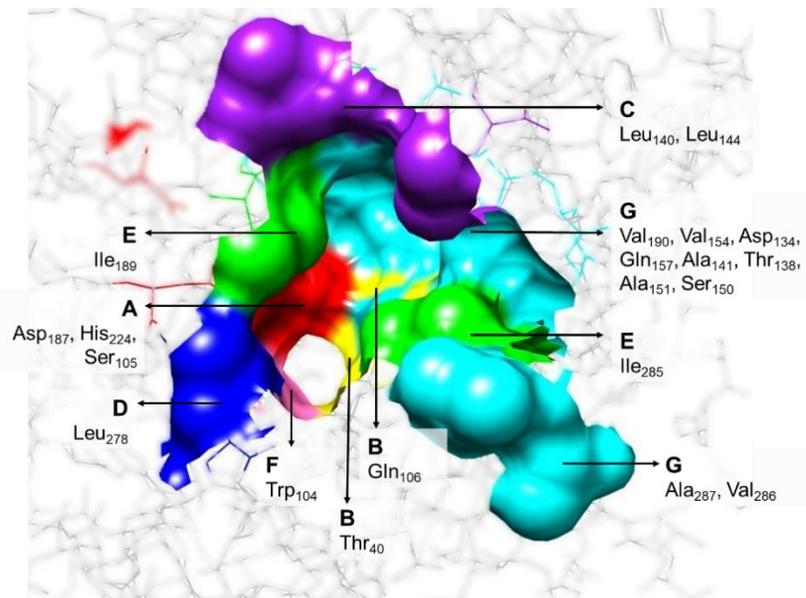


Figura 1. Topología del sitio catalítico de CaLB

El entendimiento de la capacidad sintética y catalítica de las enzimas y en especial de las lipasas cuando se emplean fuera de sus condiciones o de sus sustratos naturales sigue siendo un área de oportunidad. Actualmente no es posible afirmar que la aplicación de enzimas en transformaciones orgánicas es un tema totalmente optimizado como para emplearse como tecnología en todos los campos productivos como la industria de los alimentos, la farmoquímica o la de químicos finos. De esta área de oportunidad surge la inspiración de proponer la presente revisión, para poder brindar a químicos sintéticos, biocatalíticos y biotecnólogos, información que nos permita entender más y mejor a las enzimas, a las lipasas y en especial a CaLB.

Reacción natural y promiscua I: Mecanismo de sustitución nucleofílica en el acilo

La función del sitio oxianiónico es acoplarse a los sustratos carbonílicos naturales o no naturales y estabilizar su par de electrones; también estabiliza los electrones en estados de transición en las especies oxianiónicas en reacciones naturales o promiscuas. La tríada catalítica por su parte tiene la capacidad de llevar a cabo dos mecanismos importantes dependiendo de si la reacción es natural o promiscua.

La transformación “natural” de esta enzima cumple con las características cinéticas de un mecanismo *bi-bi-ping-pong* y desde el punto de vista químico se trata de una sustitución nucleofílica en el acilo (S_NA ; Figura 2A). Este mecanismo ha sido ampliamente estudiado y comprobado en diversos sustratos; actualmente es posible encontrar que existen tres descripciones que básicamente operan bajo la misma maquinaria catalítica: a) a través de un intermedio switteriónico, b) un mecanismo concertado y c) el más aceptado, a través de un intermedio neutro (Lima et al., 2019). En este último mecanismo, los tres aminoácidos de la tríada catalítica trabajan juntos y el grupo hidroxilo de Ser105 es activado por Asp187 e His224 para realizar una sustitución nucleofílica en el sustrato y formar un intermedio acil-enzima unido covalentemente (también llamado intermedio de Michaelis o producto de catálisis covalente, Figura 2A: A1, A2 y A3). Si se agrega un segundo sustrato nucleofílico (A4), el intermedio acil-enzima se sustituye para formar un producto de S_NA , también llamado aducto 1,2, producto de nucleólisis o en su caso producto de solvolisis. En esta segunda transformación, la diada Asp187 e His224 extrae el hidrógeno del nucleófilo y restaura al grupo hidroxilo en Ser105, que regenera la tríada y libera el producto (A5).

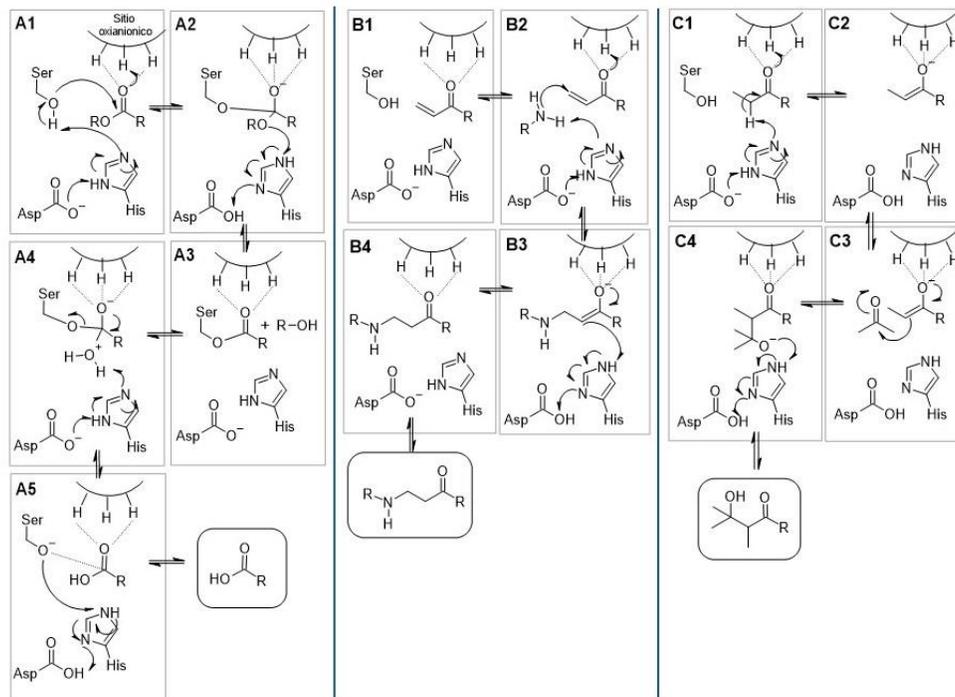


Figura 2. Tres mecanismos de transformación de CaLB: A: Transformación natural: S_NA; B: Adición de Michael y C: formación de enolatos

En la reacción natural de esta enzima el primer sustrato corresponde a tri-acilglicerol y el segundo a agua, por lo que la reacción global es la hidrólisis de tri-acilglicerol. Su uso en síntesis es debido a que el mecanismo S_NA tiene su versión promiscua al conservarse cuando se usan sustratos no naturales como ésteres, ácidos carboxílicos y anhídridos, empleando como nucleófilos alcoholes, aminas, agua o tioles y se ha empleado para formar polímeros y productos farmacéuticos. Dicho mecanismo también se conserva cuando se emplean condiciones como solución acuosa, disolventes orgánicos o líquidos supercríticos. También puede operar a nivel de reconocimiento quiral, por lo que se ha aprovechado para resolver mezclas racémicas de sustratos carbonílicos, o de segundos sustratos nucleofílicos como alcoholes o aminas (Gotor-Fernández et al., 2006).

En la Figura 3 se observan ejemplos de reacciones de hidrólisis (Figura 3A) (Velonia et al., 2005), esterificación y transesterificación (Figura 3B) (Lima, et al., 2022, Lau et al., 2004 Yu & Lutz, 2011) y aminólisis (Baldessari & Mangone, 2001. Conde et al., 2000. De Zoete et al., 1996. Garcia et al., 1993. Gill & Patel, 2006) (Figura 3E), algunas de las cuales son regioselectivas (Lavandera et al., 2004), y quimioselectivas (Garcia et al., 1994). Se han reportado polimerizaciones vía esterificación (Figura 3C y 3D) (García-Arrazola et al., 2009. Mei et al., 2003) y conservación de la actividad hidrolítica en líquidos iónicos (Campodónico et al., 2023), una variedad de disolventes (Zieniuk et al., 2020) o incluso en sinergia con MOFs (Zhang et al., 2022).

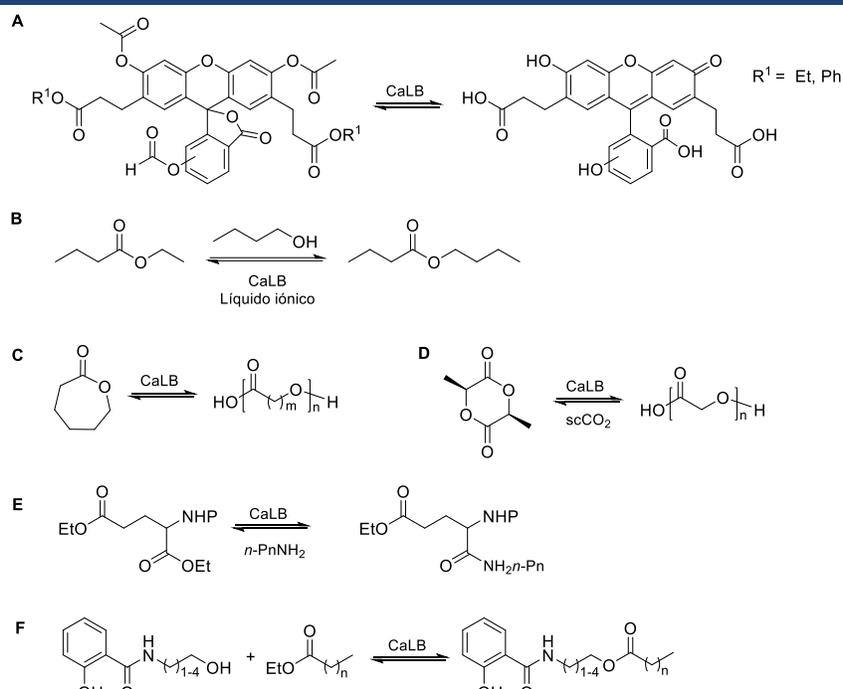
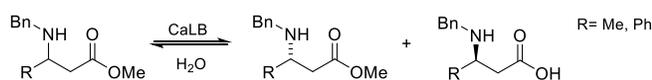


Figura 3. Ejemplos de reacciones de sustitución nucleofílica en el acilo catalizadas por CaLB. A: hidrólisis, B, C y D: esterificación, E: aminólisis.

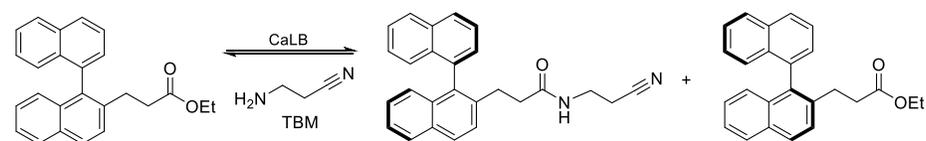
El mecanismo S_NA se ha empleado en la resolución de mezclas racémicas de carbonilos y nucleófilos. Mecanísticamente, esta enzima sigue la regla de Kazlauskas (Kazlauskas et al., 1991; Bornscheuer & Kazlauskas, 2009). Respecto a carbonilos racémicos, se resuelven ésteres vía hidrólisis (Ortega-Rojas, 2019) aminólisis (Aoyagi et al.,

2004; García-Urdiales et al., 1999; De Zoete et al., 1993), transesterificación (Cuiper et al., 1999 ; Flores-Sánchez et al., 2005) y desimetrización (Figura 4) (López-García et al., 2003; Puertas et al., 1996; Sánchez et al., 1999). Se ha demostrado que en la resolución de ésteres, la aminólisis es más eficiente que la hidrólisis.

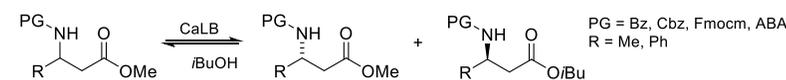
Hidrólisis



Aminólisis



Transesterificación



Desimetrización

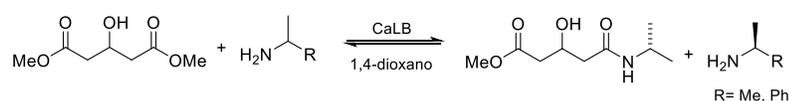


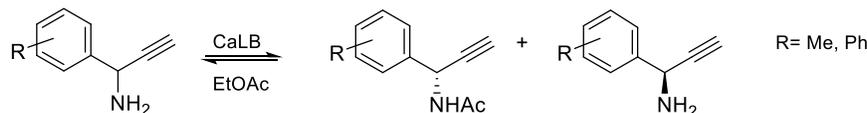
Figura 4. Ejemplos de resolución de ésteres catalizada por CaLB

Artículos

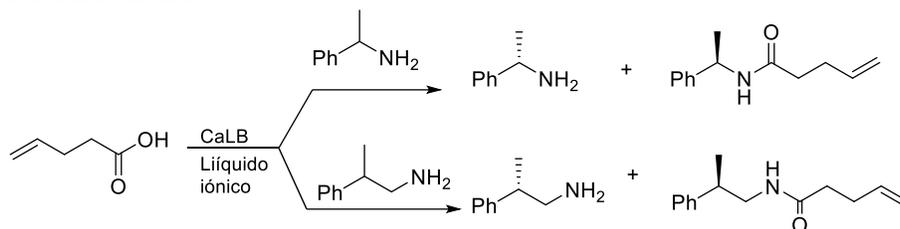
Respecto a la resolución de nucleófilos, los más recurrentes son las aminas y los alcoholes. Así, las aminas se han resuelto vía acetilación (Spelmezan et al., 2020; Campos et al., 2000; Gedey et al., 1999; González-Sabín et al., 2002; González-Sabín et al., 2004; Goswami et al., 2005; Sigmund & DiCosimo,

2004), aminólisis de ácidos (Irimescu & Kato, 2004; Prasad et al., 2005), aminólisis de ésteres (Alfonso et al., 1998; Fitz et al., 2005; Luna et al., 2002; Päiviö et al., 2012; Pozo et al., 1992; Pozo & Gotor, 1995) y resolución cinética dinámica (Figura 5) (Choi et al., 2001; Paetzold & Bäckvall, 2005).

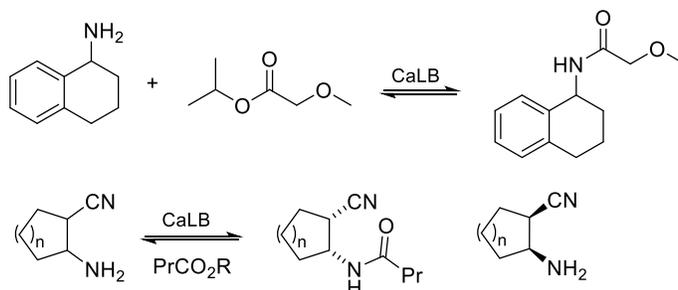
Acetilación



Aminólisis de ácidos



Aminólisis de ésteres



Resolución cinética dinámica

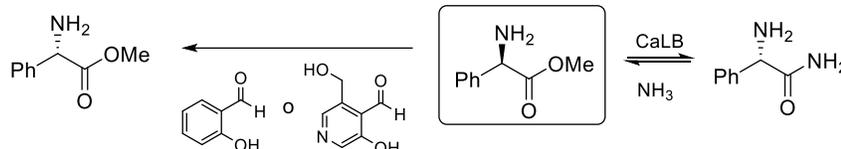
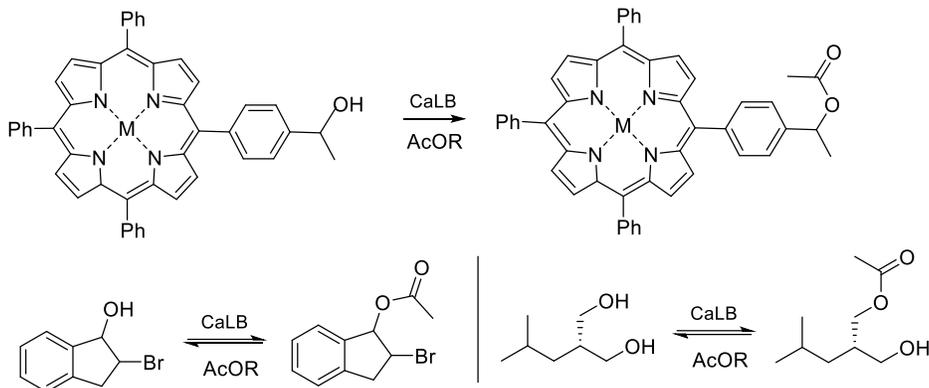


Figura 5. Ejemplos de resolución de aminas quirales inducida por CaLB

En la resolución de alcoholes quirales la transformación más recurrente es la acetilación (Henke et al., 2002; Rotticci et al., 2008). Con esta metodología se han resuelto

alcoholes acíclicos, cíclicos y desimetrización de alcoholes proquirales. Otra metodología útil es la resolución vía transesterificación (Figura 6) (Ottosson et al., 2002).

Acetilación



Transesterificación

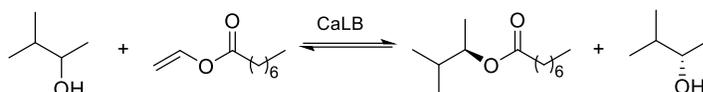


Figura 6. Ejemplos de resolución de alcoholes quirales inducida por CaLB

La resolución mecanoquímica empleando CaLB es un ejemplo de cómo la catálisis enzimática tiene compatibilidad técnica con dispositivos que pudieran ser agresivos desde el punto de vista estructural de los

biocatalizadores. No son pocos los ejemplos donde ha sido posible resolver fármacos (Pérez-Venegas et al., 2018, 2020 y 2022), aminas (Pérez-Venegas, et al. 2017) y alcoholes (Frigs, et al., 2016) (Figura 7).

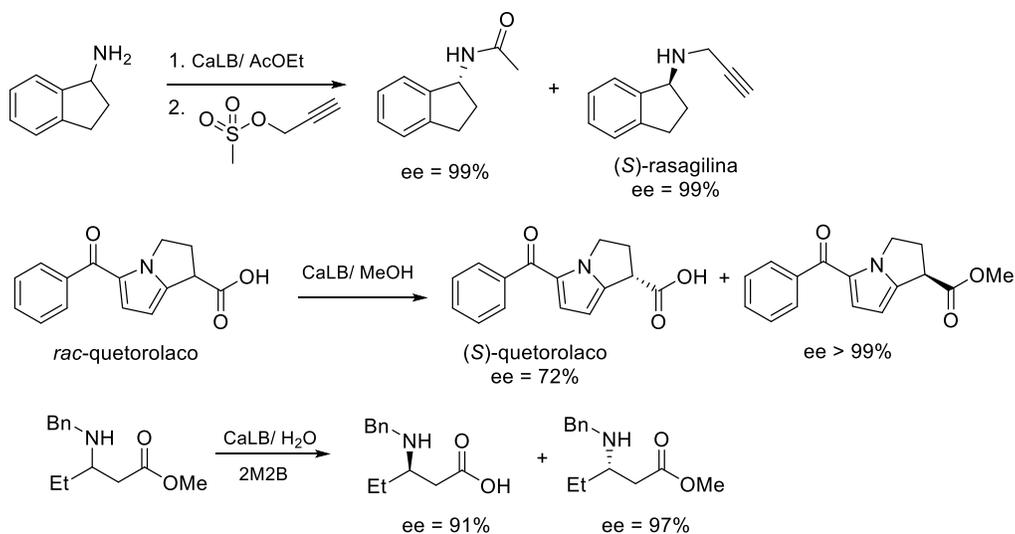


Figura 7. Ejemplos de resolución mecanoquímica empleando CaLB

Reacción promiscua II: Adición de Michael

Se han descrito dos reacciones promiscuas adicionales en el sitio de CaLB, la adición de Michael (adición 1,4) (Figura 2B) y la reacción aldólica (Figura 2C). Ambas transformaciones se logran sin catálisis covalente o formación

de algún intermedio sustrato enzima y se ha propuesto que el residuo Ser105 no participa en estas transformaciones (Torre et al., 2004; Strohmeier et al., 2009).

Las adiciones de Michael son posibles debido a que el sitio oxianiónico puede deslocalizar el

par de electrones del aceptor de Michel, formar una carga parcial positiva en posición β y un anolato, y entonces enlazar al donador de Michael (Figura 2B: B1 y B2). La función de la diada catalítica (Asp187-His224) es intercambiar el hidrógeno del donador al carbanión α y así completar la transformación para liberar el aducto de Michael (Figura 2B: B3 y B4). Gotor ha aportado importantes evidencias de que este mecanismo en particular puede operar con sustratos no carbonílicos (Torre et al., 2004).

Los ejemplos de catálisis de la adición de Michael con CaLB son adiciones de aminas secundarias a acrilonitrilo, aldehídos y ésteres, así como formación y adición de enolatos (Cai et al., 2011; Strohmeier et al., 2009) a aldehídos, cetonas, ésteres α,β -insaturados y nitros α,β -insaturados para formar enlaces C-C. Se ha documentado también la adición de peróxidos a aldehídos α,β -insaturados, adición de tioles y sulfóxidos a cetonas α,β -insaturadas (Madalińska et al., 2012) y adición de bencilamina a crotonato de metilo (Priego et al. 2009) (Figura 8).

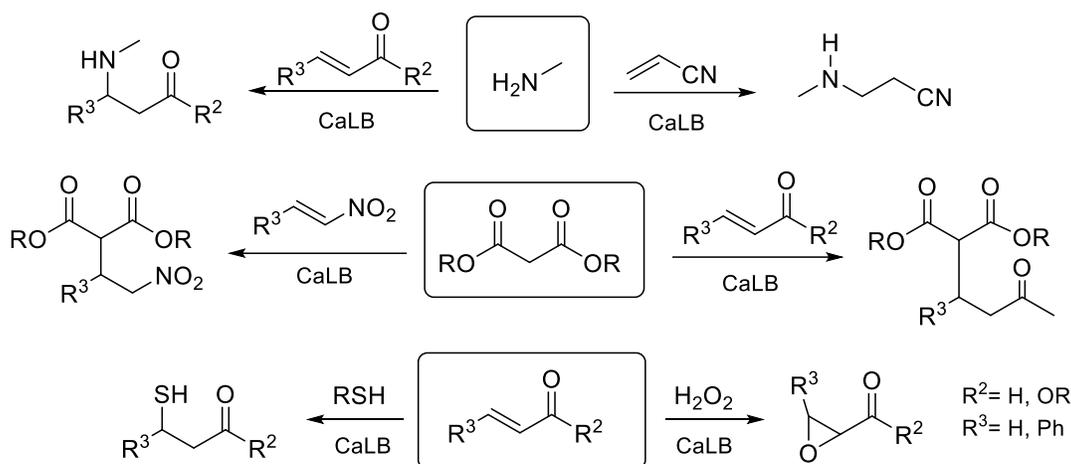


Figura 8. Adiciones de Michael catalizadas por CaLB

Se ha observado que la reacción de adición aza-Michael es quimioselectiva entre la formación β -aminoésteres y amidas cuando se emplean acrilatos y bencilamina (Figura 9). En estos sistemas ha sido posible demostrar que las adiciones tipo Michael catalizadas por CaLB tienden a favorecerse en disolventes apolares y las aminolisis en disolventes polares. El uso del disolvente adecuado utilizando como criterio de selectividad su polaridad puede ser una herramienta útil para

predecir la quimioselectividad de la reacción que llevara a cabo CaLB (Priego et al., 2009 ; Rivera-Ramírez et al., 2015 ; Steunenber et al., 2013). Nazarian y Arab también estudiaron la influencia del disolvente en la adición Aza-Michael mediante la síntesis quimioenzimática de 2-(2-benzoilhidrazinil) succinato de dietilo empleando benhidrazida y maleato de cis-dietilo catalizada por CaLB. (Figura 10) (Nazarian & Arab, 2022).

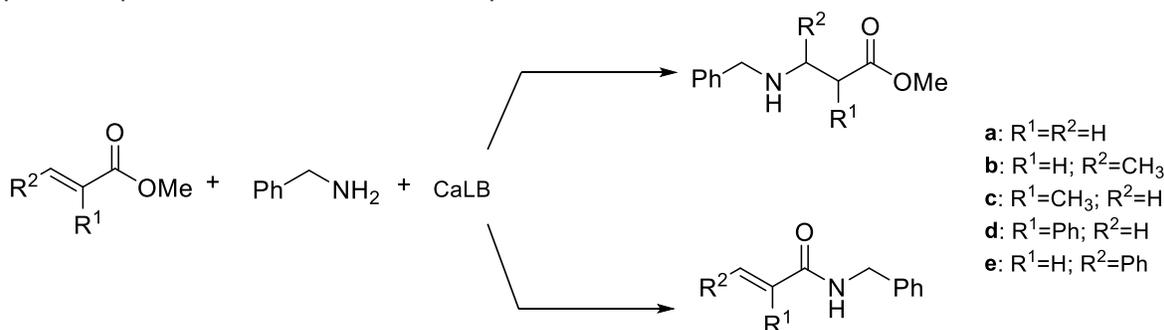


Figura 9. Quimioselectividad en las adiciones de Michael catalizadas por CaLB

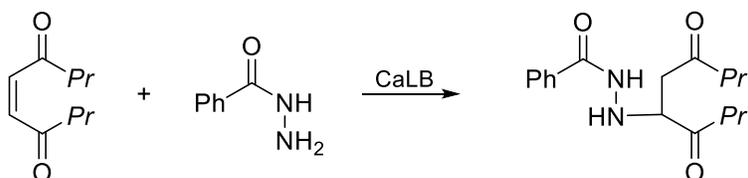


Figura 10. Síntesis quimio-enzimática de 2-(2-benzoylhidrazinil)succinato de dietilo empleando benhidrazida y maleato de *cis*-dietilo catalizada por CaLB

Reacción promiscua III: Formación de enolatos

Debido a que CaLB cataliza adiciones tipo Michael, es posible inferir que estas transcurren a través de la formación de un ión enolato el cual es neutralizado por la incorporación de un hidrógeno por parte de la diada Asp187-His224. Casi al inicio del descubrimiento de la promiscuidad de esta enzima se indagó si podría operar como una aldolasa (Figura 2C), lo cual se demostró posteriormente, sin embargo los rendimientos han sido tan bajos comparados con los obtenidos con otras enzimas que, esta función no se considera demasiado útil para emplearse en síntesis (Branneby et al., 2004; Dwivedee et al., 2018; Li et al., 2008)

En reacciones de tipo aldol catalizadas por CaLB (Figura 2C), la función de la diada Asp187-His224 es extraer el hidrógeno α del

sustrato para que entonces el sitio oxianionico estabilice al enolato (Figura 2C1 y 2 C2). La adición aldólica a un segundo grupo carbonilo liberará el nuevo producto que ahora contiene un nuevo enlace C-C (Figura 2C3 y 2C4). El mecanismo propuesto por Branneby (2004), sugiere que la histidina debe ser desprotonada para poder ser activada, funcionando como un catalizador acido-base general para posteriormente proceder con la reacción (Svedendahl et al., 2008, Patti et al., 2022).

Reacciones promiscuas no convencionales

Las reacciones no convencionales, se deben a la reactividad intrínseca de la enzima con grupos carbonilo que reactivamente interaccionan con otras funcionalidades. Un ejemplo es la adición a dobles enlaces de tioles (Figura 13) (Lou et al., 2008).

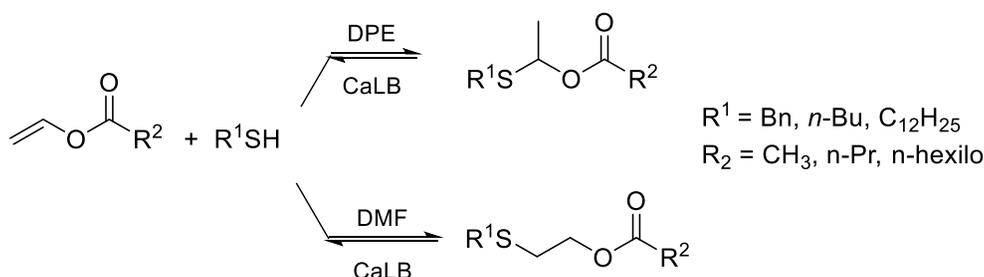


Figura 13. Adición a dobles enlaces catalizada por CaLB.

También ha sido reportada la actividad de epoxidación de CaLB en alquenos cortos, además de ser empleada en la producción de epóxidos mediante la generación de peroxiacidos y su uso en apertura de anillos de epóxidos, convirtiéndola en una gran alternativa para la reacción de epoxidación directa (Galmés et al., 2021; Svedendahl et al., 2008).

Svedendahl et al., (2008) han propuesto un mecanismo para la epoxidación directa de aldehídos α,β -insaturados catalizada por CaLB Ser105Ala mutante (Figura 11), con la cual la reacción procede mediante epoxidación indirecta, concluyendo que al igual que en otras reacciones, el bolsillo oxianion estabiliza la molécula mientras el residuo His224 funciona como un catalizador acido-base (Svedendahl et al., 2008).

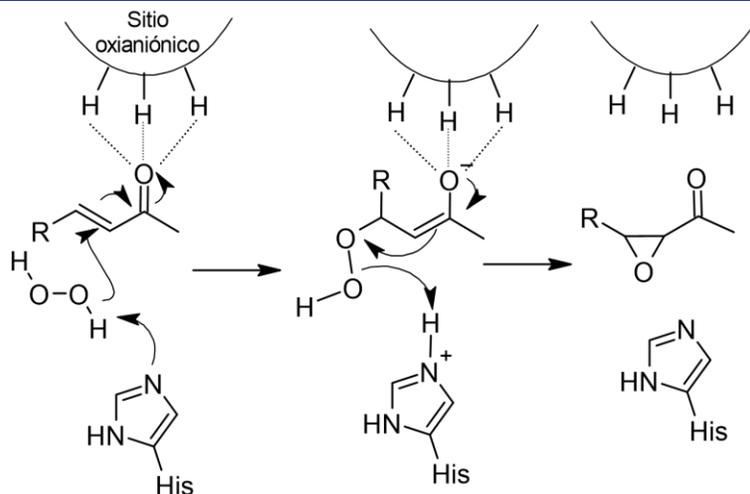


Figura 11. Reacción de epoxidación directa de un aldehído α,β -insaturado catalizada por CaLB Ser105Ala mutante.

Entre las reacciones no convencionales catalizadas por CaLB que han sido reportadas se encuentra además la reacción de aza-Diels-Alder, reacción de importancia en la síntesis de derivados de 2-azabicyclo [2.2.2] octano, componentes análogos de anestésicos locales. Yin et. al. (2017), evaluaron los efectos de diferentes variables

de reacción, tales como pH, temperatura, disolvente empleado, uso de aditivos, concentración de los sustratos por mencionar algunos, sobre el rendimiento de la reacción de aza-Diels-Alder, con el propósito de optimizar las condiciones de reacción empleando aldehídos aromáticos como sustratos (Figura 12) (Yin et al., 2017).

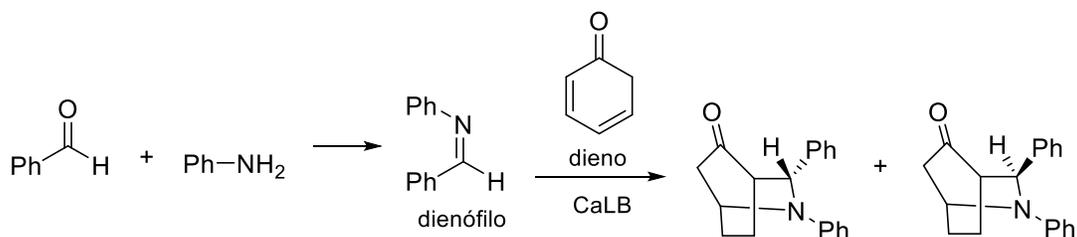


Figura 12. Reacción aza-Diels-Alder de tres componentes catalizada por CaLB

Conclusiones

CaLB cataliza una gran variedad de reacciones que podrían considerarse no convencionales gracias a su conocida promiscuidad catalítica. Dicha flexibilidad se debe a que es capaz de reconocer en su sitio catalítico sustratos carbonílicos y promover las reacciones que competen a estos, además de que esta enzima es compatible con disolventes y una variedad de condiciones de reacción, facilitando dichas reacciones químicas.

Gracias a esta propiedad, CaLB ha sido ampliamente usada en la síntesis de compuestos orgánicos con alto valor añadido,

como productos farmacéuticos y químicos finos, por mencionar algunos.

Se ha demostrado además que las alteraciones enfocadas en el sitio activo de la enzima pueden aumentar más su eficacia y especificidad hacia ciertas reacciones, como lo han demostrado estudios sobre las reacciones de adición aldólica empleando CaLB Ser105Ala mutante.

En resumen, la promiscuidad catalítica del CaLB muestra un gran potencial para expandir los límites de la síntesis orgánica y proporcionar una herramienta poderosa y versátil para la creación más eficiente y sostenible de nuevos compuestos químicos.

Referencias

- Alfonso, I., Astorga, C., Rebolledo, F., & Gotor, V. (1998). Sequential biocatalytic resolution of (f)-trans-cyclohexane-1,2-diamine. Chemoenzymatic synthesis of an optically active polyamine. *Chemical Communications*, 21, 2471–2472. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/CC99600024>
- Aoyagi, N., Kawauchi, S., & Izumi, T. (2004). Different recognitions of (E)- and (Z)-1,1'-binaphthyl ketoximes using lipase-catalyzed reactions. *Tetrahedron Letters*, 45(27), 5189–5192. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.05.051>
- Baldessari, A., & Mangone, C. P. (2001). One-pot biocatalyzed preparation of substituted amides as intermediates of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 335–341. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00018-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00018-7)
- Błaszczczyk, J., & Kiełbasiński, P. (2020). Quarter of a century after: A glimpse at the conformation and mechanism of candida antarctica lipase b. In *Crystals* (Vol. 10, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cryst10050404>
- Bornscheuer, U. T., & Kazlauskas, R. J. (2009). *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations* (2nd ed.). John Wiley & Sons.
- Branneby, C., Carlqvist, P., Hult, K., Brinck, T., & Berglund, P. (2004). Aldol additions with mutant lipase: Analysis by experiments and theoretical calculations. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 31(4–6), 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.08.005>
- Cai, J.-F., Guan, Z., & He, Y.-H. (2011). The lipase-catalyzed asymmetric C–C Michael addition. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(3–4), 240–244. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.011>
- Campodónico, P. R., Calderón, C., Alcázar, J. J., Olivares, B., Jaldin, L., & Suárez-Rozas, C. (2023). Exploring the behavior of Candida antarctica lipase B in aqueous mixtures of an imidazolium ionic liquid and its surfactant analogue. *Frontiers in Chemistry*, 11. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1289398>
- Campos, F., Bosch, M. P., & Guerrero, A. (2000). An efficient enantioselective synthesis of (R,R)-formoterol, a potent bronchodilator, using lipases. *Tetrahedron: Asymmetry*, 11(13), 2705–2717. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(00\)00238-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166(00)00238-X)
- Carlqvist, P., Svedendahl, M., Branneby, C., Hult, K., Brinck, T., & Berglund, P. (2005). Exploring the active-site of a rationally redesigned lipase for catalysis of Michael-type additions. *ChemBioChem*, 6(2), 331–336. <https://doi.org/10.1002/cbic.200400213>
- Choi, Y. K., Kim, M. J., Ahn, Y., & Kim, M. J. (2001). Lipase/palladium-catalyzed asymmetric transformations of ketoximes to optically active amines. *Organic Letters*, 3(25), 4099–4101. <https://doi.org/10.1021/ol0168622>
- Conde, S., Lopez-Serrano, P., & Martinez, A. (2000). Regioselective lipase-catalyzed g-monoamidation of d-glutamic acid diesters: effect of the N-protecting group. *Tetrahedron: Asymmetry*, 11(12), 2537–2545. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(00\)00210-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166(00)00210-X)
- Cuiper, A. D., Kouwijzer, M. L. C. E., Grootenhuys, P. D. J., Kellogg, R. M., & Feringa, B. L. (1999). Kinetic resolutions and enantioselective transformations of 5-(acyloxy)pyrrolinones using Candida antarctica lipase B: Synthetic and structural aspects. *Journal of Organic Chemistry*, 64(26), 9529–9537. <https://doi.org/10.1021/jo991062e>
- De Zoete, M. C., Dalen, A. C. K. Van, Van Rantwijk, F., & Sheldon, R. A. (1993). Ester ammoniolysis: A new enzymatic reaction. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 24, 1831–1832. <https://doi.org/10.1039/C39930001831>
- De Zoete, M. C., Kock-Van Dalen, A. C., Van Rantwijk, F., & Sheldon, R. A. (1996). A new enzymatic one-pot procedure for the synthesis of carboxylic amides from carboxylic acids. In *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (Vol. 2). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1381-1177\(96\)00009-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1381-1177(96)00009-4)
- Dhake, K. P., Tambade, P. J., Singhal, R. S., & Bhanage, B. M. (2010). Promiscuous Candida antarctica lipase B-catalyzed synthesis of β -amino esters via aza-Michael addition of amines to acrylates. *Tetrahedron Letters*, 51(33), 4455–4458. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.06.089>
- Dwivedee, B. P., Soni, S., Sharma, M., Bhaumik, J., Laha, J. K., & Banerjee, U. C. (2018). Promiscuity of Lipase-Catalyzed Reactions for Organic Synthesis: A Recent Update. In *ChemistrySelect*

(Vol. 3, Issue 9, pp. 2441–2466). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/slct.201702954>

Fitz, M., Lundell, K., Lindroos, M., Fülöp, F., & Kanerva, L. T. (2005). An effective approach to the enantiomers of alicyclic β -aminonitriles by using lipase catalysis. *Tetrahedron Asymmetry*, 16(22), 3690–3697. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2005.10.017>

Flores-Sánchez, P., Escalante, J., & Castillo, E. (2005). Enzymatic resolution of N-protected- β -amino methyl esters, using lipase B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron Asymmetry*, 16(3), 629–634. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2004.11.082>

Hernández, J. G., Frings, M., & Bolm, C. (2016). Mechanochemical Enzymatic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols under Ball-Milling Conditions. *ChemCatChem*, 8(10), 1769–1772. <https://doi.org/10.1002/cctc.201600455>

Galmés, M. A., Świderek, K., & Moliner, V. (2021). Computational Studies Suggest Promiscuous *Candida antarctica* Lipase B as an Environmentally Friendly Alternative for the Production of Epoxides. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(7), 3604–3614. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00425>

Gamboa-Velázquez, G., & Juaristi, E. (2022). Mechanoenzymology in the Kinetic Resolution of β -Blockers: Propranolol as a Case Study. *ACS Organic and Inorganic Au*, 2(4), 343–350. <https://doi.org/10.1021/acscorginorgau.1c00049>

Ganjalkhany, M. R., Ranjbar, B., Taghavi, A. H., & Tohidi Moghadam, T. (2012). Functional motions of *Candida antarctica* lipase b: A survey through open-close conformations. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040327>

García, M. J., Rebolledo, F., & Gotor, V. (1993). Chemoenzymatic Aminolysis and Ammonolysis of P-Ketoesters. In *Tetrahedron Letters* (Vol. 34, Issue 38). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)61751-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)61751-3)

García, M. J., Rebolledo, F., & Gotor, V. (1994). Lipase-catalyzed aminolysis and ammonolysis of β -ketoesters. Synthesis of optically active β -ketoamides. *Tetrahedron*, 50(23), 6935–6940. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)81346-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)81346-6)

García-Arrazola, R., López-Guerrero, D. A., Gimeno, M., & Bárzana, E. (2009). Lipase-catalyzed synthesis of poly-L-lactide using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 51(2), 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.08.014>
García-Urdiales, E., Rebolledo, F., & Gotor, V.

(1999). Enzymatic ammonolysis of ethyl (\pm)-4-chloro-3-hydroxybutanoate. Chemoenzymatic syntheses of both enantiomers of pyrrolidin-3-ol and 5-(chloromethyl)-1,3-oxazolidin-2-one. *Tetrahedron: Asymmetry*, 10(4), 721–726. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(99\)00034-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166(99)00034-8)

Gedey, S., Liljeblad, A., Fülöp, F., & Kanerva, L. T. (1999). Sequential resolution of ethyl 3-aminobutyrate with carboxylic acid esters by *Candida antarctica* lipase B. *Tetrahedron: Asymmetry*, 10(13), 2573–2581. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(99\)00261-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166(99)00261-X)

Gill, I., & Patel, R. (2006). Biocatalytic ammonolysis of (5S)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl)-5-ethyl ester: Preparation of an intermediate to the dipeptidyl peptidase IV inhibitor Saxagliptin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16(3), 705–709. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.10.021>

González-Sabín, J., Gotor, V., & Rebolledo, F. (2002). CAL-B-catalyzed resolution of some pharmacologically interesting b-substituted isopropylamines. *TETRAHEDRON: ASYMMETRY*, 13, 1315–1320. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(02\)00336-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0957-4166(02)00336-1)

González-Sabín, J., Gotor, V., & Rebolledo, F. (2004). Chemoenzymatic preparation of optically active trans-cyclohexane-1,2- diamine derivatives: An efficient synthesis of the analgesic U(-)-50,488. *Chemistry - A European Journal*, 10(22), 5788–5794. <https://doi.org/10.1002/chem.200400607>

Goswami, A., Guo, Z., Parker, W. L., & Patel, R. N. (2005). Enzymatic resolution of sec-butylamine. *Tetrahedron Asymmetry*, 16(9), 1715–1719. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2005.03.012>

Gotor-Fernández, V., Busto, E., & Gotor, V. (2006). *Candida antarctica* lipase B: An ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. In *Advanced Synthesis and Catalysis* (Vol. 348, Issues 7–8, pp. 797–812). <https://doi.org/10.1002/adsc.200606057>

Henke, E., Pleiss, J., & Bornscheuer, U. T. (2002). "Activity of lipases and esterases towards tertiary alcohols: New insights into structure-function relationships."

Irimescu, R., & Kato, K. (2004a). Investigation of ionic liquids as reaction media for enzymatic enantioselective acylation of amines. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 30(5–6), 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.05.003>
Irimescu, R., & Kato, K. (2004b). Lipase-catalyzed

- enantioselective reaction of amines with carboxylic acids under reduced pressure in non-solvent system and in ionic liquids. *Tetrahedron Letters*, 45(3), 523–525.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2003.10.210>
- Kazlauskas, R. J., E Weissfloch, A. N., Rappaport, A. T., & Cuccia, L. A. (1991). A Rule To Predict Which Enantiomer of a Secondary Alcohol Reacts Faster in Reactions Catalyzed by Cholesterol Esterase, Lipase from *Pseudomonas cepacia*, and Lipase from *Candida rugosa*. *J. Org. Chem*, 56(8), 2656–2665.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jo00008a016>
- Lau, R. M., Sorgedragger, M. J., Carrea, G., Van Rantwijk, F., Secundo, F., & Sheldon, R. A. (2004). Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: Effects on structure and activity. *Green Chemistry*, 6(9), 483–487.
<https://doi.org/10.1039/b405693k>
- Lavandera, I., Fernández, S., Ferrero, M., & Gotor, V. (2004). First Regioselective Enzymatic Alkoxyacylation of Primary Amines. Synthesis of Novel 5'- and 3'-Carbamates of Pyrimidine 3',5'-Diaminonucleoside Derivatives Including BVDU Analogues. *Journal of Organic Chemistry*, 69(5), 1748–1751. <https://doi.org/10.1021/jo035678m>
- Li, C., Feng, X. W., Wang, N., Zhou, Y. J., & Yu, X. Q. (2008). Biocatalytic promiscuity: The first lipase-catalysed asymmetric aldol reaction. *Green Chemistry*, 10(6), 616–661.
<https://doi.org/10.1039/b803406k>
- Lima, R. N., dos Anjos, C. S., Orozco, E. V. M., & Porto, A. L. M. (2019). Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. In *Molecular Catalysis* (Vol. 466, pp. 75–105). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.01.007>
- Lima, R. N., Anjos, C. S., & Porto, A. L. M. (2022). Biocatalytic synthesis of lipophilic amides by the lipase of *Candida antarctica* type B. *Molecular Catalysis*, 530, 112635.
<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2022.112635>
- López-García, M., Alfonso, I., & Gotor, V. (2003). Desymmetrization of dimethyl 3-substituted glutarates through enzymatic ammonolysis and aminolysis reactions. *Tetrahedron Asymmetry*, 14(5), 603–609. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(02\)00869-8](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(02)00869-8)
- Lou, F. W., Liu, B. K., Wu, Q., Lv, D. S., & Lin, X. F. (2008). *Candida antarctica* lipase B (CAL-B)-catalyzed carbon-sulfur bond addition and controllable selectivity in organic media. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 350(13), 1959–1962.
<https://doi.org/10.1002/adsc.200800207>
- Luna, A., Alfonso, I., & Gotor, V. (2002). Biocatalytic approaches toward the synthesis of both enantiomers of trans-cyclopentane-1,2-diamine. *Organic Letters*, 4(21), 3627–3629.
<https://doi.org/10.1021/ol026574l>
- Madalińska, L., Kwiatkowska, M., Cierpień, T., & Kielbasiński, P. (2012). Investigations on enzyme catalytic promiscuity: The first attempts at a hydrolytic enzyme-promoted conjugate addition of nucleophiles to α,β -unsaturated sulfinyl acceptors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 81, 25–30.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.05.002>
- Mei, Y., Kumar, A., & Gross, R. (2003). Kinetics and mechanism of *Candida antarctica* lipase B catalyzed solution polymerization of ϵ -Caprolactone. *Macromolecules*, 36(15), 5530–5536. <https://doi.org/10.1021/ma025741u>
- Monteiro, R. R. C., Virgen-Ortiz, J. J., Berenguer-Murcia, Á., da Rocha, T. N., dos Santos, J. C. S., Alcántara, A. R., & Fernandez-Lafuente, R. (2021). Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. *Catalysis Today*, 362, 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.026>
- Nazarian, Z., & Arab, S. S. (2022). Solvent-dependent activity of *Candida antarctica* lipase B and its correlation with a regioselective mono aza-Michael addition - experimental and molecular dynamics simulation studies. *Heliyon*, 8(8).
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10336>
- Ortega-Rojas, M. A. (2019). Síntesis y resolución de β -y γ -amino ésteres catalizada por CaL-B [UAEM].
<http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/3122>
- Ottosson, J., Fransson, L., King, J. W., & Hult, K. (2002). Size as a parameter for solvent effects on *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1594(2), 325–334.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00324-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00324-7)
- Paetzold, J., & Bäckvall, J. E. (2005). Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of primary amines. *Journal of the American Chemical Society*, 127(50), 17620–17621.
<https://doi.org/10.1021/ja056306t>
- Päiviö, M., Perkiö, P., & Kanerva, L. T. (2012). Solvent-free kinetic resolution of primary amines catalyzed by *Candida antarctica* lipase B: Effect of immobilization and recycling stability. *Tetrahedron Asymmetry*, 23(3–4), 230–236.

<https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2012.02.008>

Patti, A.; Sanfilippo, C. Stereoselective Promiscuous Reactions Catalyzed by Lipases. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 2675. <https://doi.org/10.3390/ijms23052675>

Pérez-Venegas, M., & Juaristi, E. (2018). Mechanoenzymatic resolution of racemic chiral amines, a green technique for the synthesis of pharmaceutical building blocks. *Tetrahedron*, 74(44), 6453–6458. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.09.029>

Pérez-Venegas, M., Reyes-Rangel, G., Neri, A., Escalante, J., & Juaristi, E. (2017). Correction: Mechanochemical enzymatic resolution of N-benzylated-β₃-amino esters. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 13, 2128–2130. <https://doi.org/10.3762/bjoc.13.210>

Pérez-Venegas, M., Rodríguez-Treviño, A. M., & Juaristi, E. (2020). Dual Mechanoenzymatic Kinetic Resolution of (±)-Ketorolac. *ChemCatChem*, 12(6), 1782–1788. <https://doi.org/10.1002/cctc.201902292>

Pozo, M., & Gotor, V. (1995). Double Enantioselective Enzymic Synthesis of Carbonates and Urethanes. *Tetrahedron: Asymmetry*, 6(11), 2797–2802. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0957-4166\(95\)00369-Z](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0957-4166(95)00369-Z)

Pozo, M., Pulido, R., & Gotof, V. (1992). Vinyl Carbonates as Novel Alkoxy-carbonylation Reagents in Enzymatic Synthesis of Carbonates. *Tetrahedron*, 48(31), 6477–6484. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)88237-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)88237-5)

Prasad, A. K., Husain, M., Singh, B. K., Gupta, R. K., Manchanda, V. K., Olsen, C. E., & Parmar, V. S. (2005). Solvent-free biocatalytic amidation of carboxylic acids. *Tetrahedron Letters*, 46(26), 4511–4514. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.04.121>

Priego, J., Ortíz-Nava, C., Carrillo-Morales, M., López-Munguía, A., Escalante, J., & Castillo, E. (2009). Solvent engineering: an effective tool to direct chemoselectivity in a lipase-catalyzed Michael addition. *Tetrahedron*, 65(2), 536–539. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.10.103>

Puertas, S., Rebolledo, F., & Gotor, V. (1996). Enantioselective Enzymatic Aminolysis and Ammonolysis of Dimethyl 3-Hydroxyglutarate. Synthesis of (R)-4-Amino-3-hydroxybutanoic Acid. *J. Org. Chem*, 61(17), 6024–6027. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jo960468d>
Rivera-Ramírez, J. D., Escalante, J., López-

Munguía, A., Marty, A., & Castillo, E. (2015). Thermodynamically controlled chemoselectivity in lipase-catalyzed aza-Michael additions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 112, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.12.009>

Rotticci, D., Ottosson, J., Norin, T., & Hult, K. (2008). *Candida antarctica* Lipase B a tool for preparation of optically alcohols. In *Enzymes in Nonaqueous Solvents* (Vol. 15, p. 261). Humana Press Inc.

Sánchez, V. M., Rebolledo, F., & Gotor, V. (1999). *Candida antarctica* lipase-catalyzed doubly enantioselective aminolysis reactions. Chemoenzymatic synthesis of 3-hydroxypyrrolidines and 4-(Silyloxy)-2-oxopyrrolidines with two stereogenic centers. *Journal of Organic Chemistry*, 64(5), 1464–1470. <https://doi.org/10.1021/jo981630a>

Sigmund, A. E., & DiCosimo, R. (2004). Enzymatic resolution of (RS)-2-(1-aminoethyl)-3-chloro-5-(substituted) pyridines. *Tetrahedron Asymmetry*, 15(18), 2797–2799. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2004.07.043>

Spelmezan, C. G., Bencze, L. C., Katona, G., Irimie, F. D., Paizs, C., & Tos, M. I. (2020). Efficient and stable magnetic chitosan-lipase B from *Candida antarctica* bioconjugates in the enzymatic kinetic resolution of racemic heteroarylethanol. *Molecules*, 25(2). <https://doi.org/10.3390/molecules25020350>

Steunenbergh, P., Sijm, M., Zuilhof, H., Sanders, J. P. M., Scott, E. L., & Franssen, M. C. R. (2013). Lipase-catalyzed aza-michael reaction on acrylate derivatives. *Journal of Organic Chemistry*, 78(8), 3802–3813. <https://doi.org/10.1021/jo400268u>

Strohmeier, G. A., Sovic, T., Steinkellner, G., Hartner, F. S., Andryushkova, A., Purkarthofer, T., Glieder, A., Gruber, K., & Griengl, H. (2009). Investigation of Lipase-Catalyzed Michael-type Carbon-Carbon Bond Formations. *Tetrahedron*, 65(29), 5663–5668. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.05.042>

Svedendahl, M., Carlqvist, P., Branneby, C., Allnér, O., Frise, A., Hult, K., Berglund, P., & Brinck, T. (2008). Direct epoxidation in *Candida antarctica* lipase B studied by experiment and theory. *ChemBioChem*, 9(15), 2443–2451. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800318>

Svedendahl, M., Hult, K., & Berglund, P. (2005). Fast carbon-carbon bond formation by a promiscuous lipase. *Journal of the American Chemical Society*, 127(51), 17988–17989. <https://doi.org/10.1021/ja056660r>

Tjørnelund, H. D., Vind, J., Brask, J., Woodley, J. M., & Peters, G. H. J. (2023). *Candida antarctica* lipase B performance in organic solvent at varying water activities studied by molecular dynamics simulations. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 5451–5462. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.10.049>

Torre, O., Alfonso, I., & Gotor, V. (2004). Lipase catalysed Michael addition of secondary amines to acrylonitrile. *Chemical Communications*, 4(15), 1724–1725. <https://doi.org/10.1039/b402244k>

Uppenberg, J., Ohmer, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G. J., Patkar, S., Waagen, V., Anthomen, T., & Jones, T. A. (1995). Crystallographic and Molecular-Modeling Studies of Lipase B from *Candida antarctica* Reveal a Stereospecificity Pocket for Secondary Alcohols+>\$. In *Biochemistry* (Vol. 34). <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bi00051a035>

Uppenberg, J., Shamkant, P., Bergfors, T., & Jones, T. A. (1994). Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *J. Mol. Biol.*, 235, 790–792. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1035>

Velonia, K., Flomenbom, O., Loos, D., Masuo, S., Cotlet, M., Engelborghs, Y., Hofkens, J., Rowan, A. E., Klaffer, J., Nolte, R. J. M., & De Schryver, F. C. (2005). Single-enzyme kinetics of CALB-catalyzed hydrolysis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 44(4), 560–564. <https://doi.org/10.1002/anie.200460625>

Wu, M. Y., Li, K., He, T., Feng, X. W., Wang, N., Wang, X. Y., & Yu, X. Q. (2011). A novel enzymatic tandem process: Utilization of biocatalytic promiscuity for high stereoselective synthesis of 5-hydroxyimino-4,5-dihydrofurans. *Tetrahedron*, 67(14), 2681–2688. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.01.060>

Yin, D. H., Liu, W., Wang, Z. X., Huang, X., Zhang, J., & Huang, D. C. (2017). Enzyme-catalyzed direct three-component aza-Diels–Alder reaction using lipase from *Candida* sp. 99–125. *Chinese Chemical Letters*, 28(1), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2016.10.015>

Yu, Y., & Lutz, S. (2011). Circular permutation: A different way to engineer enzyme structure and function. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 29, Issue 1, pp. 18–25). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.10.004>

Zhang, X., Qi, F., Qi, J., Yang, F., Shen, J., Cai, X., Liu, Z., & Zheng, Y. (2022). Efficient enzymatic synthesis of L -ascorbyl palmitate using *Candida antarctica* lipase B-embedded metal-organic framework. *Biotechnology Progress*, 38(1). <https://doi.org/10.1002/btpr.3218>

Zieniuk, B., Fabiszewska, A., & Białecka-Florjańczyk, E. (2020). Screening of solvents for favoring hydrolytic activity of *Candida antarctica* Lipase B. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(4), 605–613. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02252-0>

Mejora en el manejo de residuos orgánicos desde una planta de bivalvos *Mytilus chilensis* para su directa disposición en suelos Catálisis de residuos orgánicos

¹Diego Bustos, ¹Pamela Olivares-Ferreti, ¹Viviana Chavez, ²Hector Herrera y ^{1,3}Jorge Parodi

¹Laboratorio Tonalli Ltda., Temuco, Chile

²Mares limpios Spa, Puerto Montt, Chile

³Departamento de análisis de datos, Facultad de Ciencias Sociales y Humanidades, Universidad Autónoma de Chile, Temuco, Chile

Correspondencia

*Jorge Parodi

Universidad Autónoma de Chile,
Departamento de análisis de Datos,
Temuco,
Chile

jorge.parodi@uautonoma.cl

Jorge Parodi ORCID: 0000-0002-9117-5433

Pamela Olivares-Ferretti ORCID: 0000-0001-5759-3271

Resumen

Los residuos orgánicos provenientes de la industria son un problema de manejo. En particular porque se reubican principalmente en vertederos donde se desaprovecha su potencial nutritivo. La industria acuícola produce elevados volúmenes de residuos orgánicos. Como el manejo de bivalvos, que genera materia orgánica y conchas, que se pierden. La aplicación de materia orgánica en suelo es algo conocido y habitual, pero genera problemas de olores y la atracción de vectores, derivando en un problema de salud pública y debido a ello no es posible disponerlo directamente. Estudios previos han demostrado que el uso de surfactantes, en ciertas combinaciones, generan craqueo catalítico de manera enzimática de la materia orgánica sin la generación de olor. Nos propusimos evaluar un compuesto surfactante para determinar si reducía la generación de olor desde la materia orgánica generada en la mitilicultura y la factibilidad de disponerlo en el suelo. Nuestros resultados indican que usar concentraciones entre 0,5 a 1 % del catalizador sobre materia orgánica derivada de mitilidos, reduce significativamente el olor y previene la formación de ácidos orgánicos volátiles. Sumado a eso, demostró una respuesta cinética, dependiente del tiempo y concentración para la generación de un reportero de nitritos como indicador de la degradación proteínicas. Interesantemente, el material catalizado no mostró ser tóxico en reporteros para agua dulce, no generó efectos fitotóxicos en pruebas de germinación y logra generar un aumento en las concentraciones de materia orgánica en suelo. Estos datos no permiten indicar que se genera un tipo de compost denominado enmienda orgánica ya que es materia disponible directa al suelo, esto permite tomar este tipo de residuos y darle un destino en suelos degradados para ser recuperados y reducir la descarga en vertederos.

Palabras Claves: Biosensores; Catalizador; Mitilidos; Residuos; Economía circular.

Improved management of organic waste from a *Mytilus chilensis* bivalve plant for direct disposal in soils Catalysis of organic waste

Abstract

Organic wastes from industry are a management problem. In particular because they are mainly relocated to landfills where their nutritional potential is wasted. The aquaculture industry produces high volumes of organic waste. Such as the handling of bivalves, which generates organic matter and shells, which are lost. The application of organic matter in soil is something known and common, but it generates odor problems and attracts vectors, resulting in a public health problem and because of this it is not possible to dispose of it directly. Previous studies have shown that the use of surfactants in certain combinations generate enzymatic catalytic cracking of organic matter without generating odor. We set out to evaluate a surfactant compound to determine if it reduced odor generation from organic matter generated in miticides and the feasibility of disposing of it in the soil. Our results indicate that using concentrations between 0.5 to 1 % of the catalyst on organic matter derived from mytilids significantly reduces odor and prevents the formation of volatile organic acids. In addition, it demonstrated a time- and concentration-dependent kinetic response for the generation of a nitrite reporter as an indicator of protein degradation. Interestingly, the catalyzed material did not show to be toxic in freshwater reporters and did not generate phytotoxic effects in germination tests and manages to generate an increase in the concentrations of organic matter in the soil. These data do not allow to indicate that a type of compost called organic amendment is generated, since it is matter available directly to the soil, this allows to take this type of waste and give it a destination in degraded soils to be recovered and reduce the discharge in landfills.

Key Words: *Biosensors; Biosensors; Catalyst; Mitilides; Waste; Circular Economy*

Introducción

La obtención de nutrientes para los cultivos es un problema en las faenas agrícolas (Rahman et al., 2021), en la actualidad las fuentes de nitrógeno principalmente vienen de compuestos nitrogenados, que deben ser incorporados a los cultivos y que tienen un alto costo (Pacheco-Ruíz et al., 2004). Nuevas fuentes, que permiten utilizar desechos orgánicos, parecen ser fuentes para entregar nutrientes al suelo (Santos et al., 2021; Zhang et al., 2021). Uno de estos modelos es el compostaje de materia orgánica para producir tierra con un alto valor de materia orgánica, para las faenas agrícolas (Gurusamy et al., 2021; Xie et al., 2021). El hacer compostaje es una estrategia para reducir los volúmenes de basura orgánica, reduce un problema tanto a nivel industrial como hogareño con los residuos orgánicos (Lett, 2014). Pero ¿cómo ocurre el compostaje? A grandes rasgos es un proceso químico-biológico bastante complejo que concentra el proceso de descomposición,

permitiendo controlar mejor sus variables, logrando una mejor eficiencia. Sin embargo, tiene algunos requisitos de entrada y proceso que limitan su acción, además genera un tipo de producto que no siempre es utilizado de manera completa y requiere diversos componentes biológicos (Pascual et al., 1999). El proceso de descomposición se refiere a cómo el material orgánico muerto se degrada en moléculas simples, liberando materia orgánica e inorgánica al medio. El proceso de descomposición (estabilización) de la materia orgánica por la acción biológica es un fenómeno intrínseco a la vida y fundamental en los ecosistemas. En este proceso la presencia de necrobiota (bacterias, hongos, protozoos, etc.) corresponde a los organismos saprofitos que dan inicio al proceso liberando moléculas que alimentan a los sucesivos eslabones tróficos (Griffiths et al., 2020).

Los dos modelos principales de descomposición son anaerobio o fermentativo y aerobio. En el primero los compuestos orgánicos se descomponen por la acción de organismos vivos que no requieren aire en el sentido normal. Estos organismos utilizan nitrógeno, fósforo y otros nutrientes para vivir y desarrollar protoplasma celular, pero reducen el nitrógeno orgánico a ácidos orgánicos y amoníaco (Boros et al., 2020). Para una descomposición eficiente también se deben considerar factores como la temperatura, siendo este un factor clave, esta biomasa en descomposición alcanza su propia temperatura interna y la temperatura ambiente regula la velocidad del proceso (Benbow et al., 2020; Boros et al., 2020). Otros factores relevantes serán el acceso al oxígeno y la acción mecánica producto de corrientes que permite mover capas de agentes saprofitos y el tamaño de las partículas o matriz de descomposición (Guo et al., 2021).

En forma general, el compostaje permite poner en las mejores condiciones lo descrito como el proceso de descomposición, en forma general un sistema cerrado que permite generar las condiciones fisicoquímicas para que esto ocurra, acumulando temperatura y nutrientes para la siguiente fase en una forma mucho más eficiente (Canet & Pomares, 1995). En la primera etapa el compost alcanza una alta temperatura y entrega lo suficiente elementos energéticos para que se inicie el proceso de descomposición, esta etapa es clave por la cantidad de gases que se generan y que es deseable que queden dentro del equipo de compostaje atrapados (Andreux, 1996; Graça et al., 2021), es quizás uno de los problemas del compostaje, domiciliario y de ahí la recomendación de no usar ciertos productos de entradas como proteínas animales, por los residuos formados y como los fermentos atraen vectores en especial moscas, como la de la fruta (Selvam et al., 2021).

Además de otros que se comienzan a describir, como el uso de los gases, la transferencia de resistencias, la degradación de antibióticos (Ezugworie et al., 2021; He et al., 2020). Se han indicado varias modificaciones a los sistemas de compostaje, que permiten reducir sus impactos, usar cierto tipos de sustratos para reducir la generación

de gases (Wong et al., 2009) también el incorpora mejoras, para la producción de compost como por ejemplo enmiendas orgánicas (tierra de hojas) (Stewart-Wade, 2020), el uso de minerales (Margaritis et al., 2018) y otras estrategias, lo que indica que aún estamos conociendo lo que ocurre dentro de una compostera y como esta tiene impacto en la generación de nutrientes, en especial nitrógeno (Wang et al., 2013). Sin duda, pese a esto problemas, el compostar materia orgánica es una gran opción para el manejo de residuos, pero que presentan algunas desventajas (Al-Ghouthi et al., 2021).

Nos hemos propuesto evaluar un compuesto, que tenga la capacidad de catalizar la materia orgánica, lo que permite generar la liberación de nutrientes desde ella y pueda servir para mejorar suelos de faenas agrícolas, debemos considerar que un catalizador en química se define como la capacidad de reducir la energía necesaria para transformar un sustrato en un producto, este fenómeno esta generado por moléculas con capacidad enzimática, que permite generar una curva típica de reacción, con constantes definidas en la ecuación de Michaelis-Menten (Estrella-González et al., 2019). Una molécula que tenga esta forma de reacción se podrá considerar un catalizador enzimático y permite reducir la energía y por ende el tiempo de la reacción (Estrella-González et al., 2019). Ese es el principio del compostaje, lograr por medio de condiciones cerradas acelera un proceso bioquímico, acelerar un reacción (Bao et al., 2021), Dentro de esto, se ha indicado que material generado en sistemas orgánicos, pueden ser descargados como enmienda orgánica, los cuales tiene ciertas características, desde su contenido de materia orgánica, humedad y propiedades fisicoquímicas, este sistema puede ser usado en faenas agrícolas como fertilizante y es una alternativa al compostaje, por tomar menos tiempo, pero de menor poder nutricional según las fuentes de origen (Abdalla et al., 2020; Stewart-Wade, 2020). El desarrollo del compuesto Catalizador, por parte de la empresa TEQUIA, fue evaluado laboratorio, midiendo compuestos orgánicos que se liberan desde la materia orgánica, expuesta al compuesto, con el fin de producir enmienda orgánica que se puede utilizar en faenas agrícolas, en el futuro desde diversas materias orgánicas y sin la generación de olor

o restricción de uso de fuentes, incorporando residuos industriales a este proceso.

Métodos

Desarrollo catalizador

El catalizador, CaDOS® es un producto registrado como detergente enzimático según norma de productos en la legislación nacional. Es una mezcla compleja de compuestos químicos y el surfactante aniónico sodio dodecibenceno sulfonato (SDBS) como principio activo, en un ambiente alcalino. El compuesto ha sido reportado al servicio nacional de medio ambiente en Chile y presentado al Servicio Agrícola Ganadero (SAG), para su uso en suelo.

Obtención de muestras

El material fue obtenido desde una planta de tratamiento de residuos de la mitilicultura ubicada en Chiloé, que contenía restos principalmente conchas y carne en descomposición. Las muestras fueron tomadas por la empresa Mares Limpios y reunidas en Puerto Montt y enviadas a nuestro laboratorio a 4 °C. Las muestras se almacenaron en un refrigerador antes de su proceso. El material fue molido en mortero en nuestro espacio para medir y comparar el tamaño de partículas, el material sin moler y molido fue catalizado con diluciones crecientes del catalizador en concentraciones V/V y por tiempo crecientes según cada experimento. El material resultante se le denomina catalizado y tiene su origen en materia orgánica tratada con CaDOS

Evaluación de olor

Se pidió a observadores independientes que indiquen desagradado en una escala subjetiva de 0 a 4, esto se registró antes del tratamiento, una vez aplicado el tratamiento y en muestras por el mismo tiempo sin tratamiento, esto según las consideraciones de la norma técnica chilena NCh3190 sobre observaciones estáticas o terrenos de la evaluación ambiental de olores por olfatoria dinámica.

Medición de nitritos

Se uso un espectrofotómetro Hanna instrumento modelo HI83399-02 para la medición se usó una serie de reactivos Hanna, estos reactivos siguen una adaptación del método del sulfato ferroso en el cual la reacción entre el nitrito y el reactivo provoca

un cambio de color en la muestra. Para el nitrato se usa la adaptación del método de reducción de cadmio. La reacción entre nitrato-nitrógeno y el reactivo causa un tono ámbar en la muestra. En ambos casos la intensidad del color se determina mediante un fotómetro compatible y la concentración se mostrará en mg/L (ppm) de nitrito o nitrato.

Medición de Nitrógeno, Potasio y Fosfato

Se usará un espectrómetro Hanna instrumento modelo HI83399-02 para la medición se usarán técnicas bioquímicas recomendadas por Hanna instrumentos, según norma EPA. Para el potasio se usará una modificación de las técnicas de turbimetría basada en tetrafenilborato. Para el nitrógeno se usará las técnicas del método cromatográfico ácido, como medida indirecta de nitritos y nitratos. Para el fosfato, se usará un método adaptado del ácido ascórbico y se estimará indirectamente la concentración de fósforo, en todos los casos la intensidad del color se determina mediante un fotómetro compatible y la concentración se mostrará en mg/L (ppm) de los distintos metabolitos.

Pruebas de granulometría, tamaño de partículas

Las muestras fueron sometidas a degradación física por tiempo de 1 a 2 hrs y luego se tomaron las muestras molidas y se llevan en una placa con 1 mL de agua destilada en un pocillo a ser micro fotografiadas con un estereomicroscopio y digitalizadas con una cama Celeron 50 mp. Se procesan las imágenes con el sistema ImageJ y se usa el "plugin" de análisis de partículas para estimar tamaño y distribución. La distribución de partículas fue graficada con el programa Graphpad Prism versión 9.4.1, observando su valores centrales y dispersión comparando las distribuciones de los tamaños.

Prueba de ecotoxicología

Las pruebas de ecotoxicidad se realizaron a los residuos de materia orgánica tratadas con el catalizador en forma diluida en % V/V. Por la posibilidad que material catalizado pueda ser lixiviados a napas de agua en los terrenos, es importante evaluar que el material siga siendo inocuo en el ambiente. Los especímenes *Daphnia magna* se utilizaron de acuerdo con la norma NCh 2083: Con temperatura constante 16°C, con un ciclo luz/oscuridad (12 h/12 h). El agua de cultivo para *D. magna* se preparó con 25 mL de

soluciones salinas (cloruro de calcio: 11,76 gr/L; sulfato de magnesio: 4,93 gr/L; bicarbonato sódico: 2,59 gr/L; cloruro de potasio: 0,23 gr/L), y se llena hasta 1000 ml con agua filtrada destilada. Luego, el agua se airea durante 24 horas antes de su uso. La densidad de cultivo creciente fue de 10 a 15 organismos de *D. magna* por 200 ml de agua, se colectaron neonatos y se sembraron 10 por envase, en 3 réplicas. Se mantiene a 15 °C durante el experimento y se evaluaron las formas móviles como vivas después de 24 hrs.

Prueba de germinación y afloramiento

Se utilizó como modelo la especie *Solanum lycopersicum*. Para los ensayos de germinación se ubicaron 5 semillas las que se dispusieron en una matriz sólida. Cada condición, control tierra y tratamiento, una mezcla de tierra con material catalizada de la planta de mitílicos. Se registró el día en que germinaron las semillas. Sucesivamente, en otra serie experimental, se monitorearon temporalmente las semillas, observando su crecimiento en el tiempo. Para el riego del control se utilizó agua corriente y para tratamiento se utilizó una mezcla con sobrenadante del lodo catalizado en concentraciones crecientes V/V (0,1-5%). El registro del crecimiento (en centímetros) del tallo de la semilla germinada fue diario, como indicativo del efecto del compuesto en las plantas. Las plantas fueron colectadas al día

10 de crecimiento de la plántula y se fotografiaron sus raíces. Para el análisis cuantitativo de la morfología de la raíz se usó el programa ImageJ y el "plugin" SNT, con el fin de estimar su área de desarrollo y compararla en las diversas condiciones.

Análisis de datos

Los datos se graficaron y fueron tratados con pruebas estadísticas de normalidad, con una prueba de ANOVA de dos vías con un post test de bonferroni, usando el programa Prism gradphad versión 9, los datos son presentado en promedio más menos SEM, un $p > 0,5$ se considerada como significativo

Resultados

Manejo del material, molido para disposición

El material recibido fue molido en forma manual y manejado por imagen para poder observar cambios en su tamaño. En la figura 1A, se observa la distribución del tamaño de las conchas antes del proceso con un tamaño promedio de 13 mm, luego de la molienda mecánica simple se logra reducir el tamaño a 7 mm, siendo un cambio significativo en el tamaño del material. Este cambio, puede significar un mejor manejo del material para su catalizacion o su disposición en suelos.

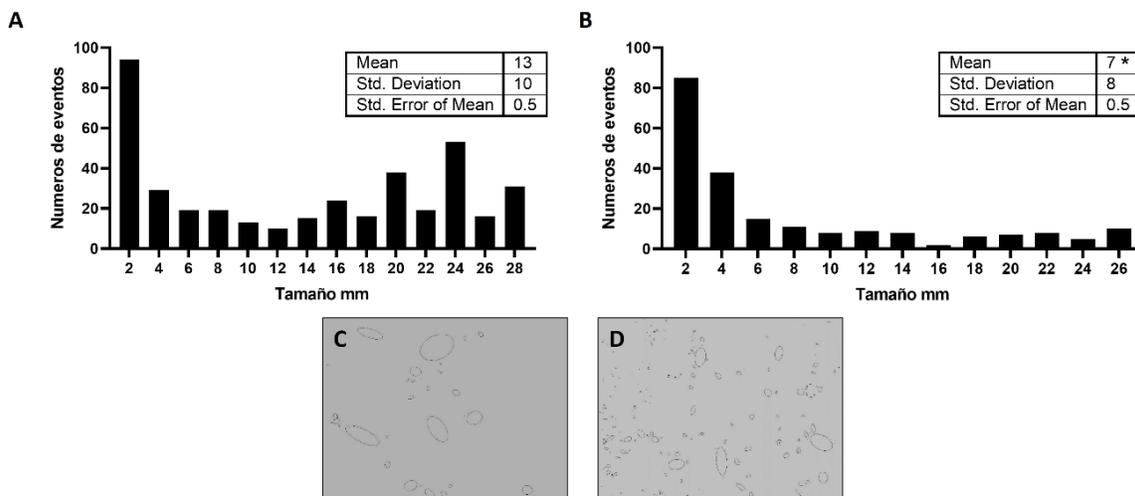


Figura 1. Manejo del material. En A medidas del tamaño de partículas de material original. En B medidas de partículas logradas después de moler el material. C, imagen representativa del análisis de partículas, sin moler, D imagen representativa del análisis de partículas molidas. Las barras son histogramas de eventos, de 3 experimentos independientes en 3 réplicas. El * es para un $p > 0.05$ indicando diferencia significativa en los promedios

Apreciación del olor desde las muestras, efecto de la concentración

Muchos de los problemas de usar materia orgánica, en faenas tiene que ver con la liberación de olores desagradables, esto por el proceso de descomposición anaeróbica (Xu et al., 2021), el proceso de compostaje busca precisamente en condiciones cerrada, acelerar esto y reducir el problema (Xie et al., 2021). El material sin moler fue expuesto a concentraciones creciente del Catalizador logrando reducir la percepción del olor como se muestra en la figura 2A, del mismo modo le

material molido también fue sometido al proceso de control de olor, como se observa en la figura 2B, mostrando que puede controlarse el olor del material, sin generar olor final en material. Este dato es clave para el manejo de residuos, porque lo que principalmente exige la norma ambiental para el uso de este material en suelos, es que no genere olores, que puedan atraer vectores y ser un problema de salud pública. El resultado permite sugerir un mejor uso del material a descartar desde la planta de mitílicos.

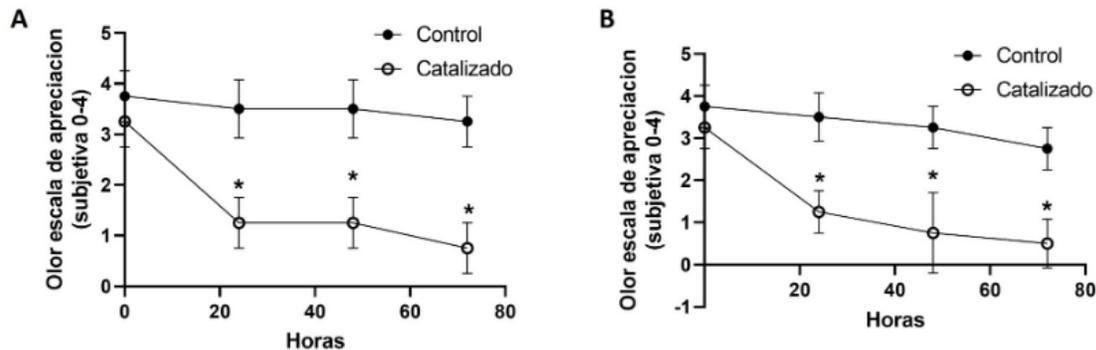


Figura 2. Estudios de olor, en A curva de percepción olor material sin moler, en B curva de percepción olor material molido. Los puntos son promedio \pm SEM, de 3 experimentos independientes en 3 replicas. El * es para un $p >$ de 0.05 indicando diferencia significativa en los promedios

Medición de la concentración de nitritos, estudio cinético y de dosis

El uso de moléculas nitrogenadas se ha descrito como una forma de evaluar calidad de compost y de tierras, en particular la concentración de nitritos es una forma de además de rompiendo de macromoléculas como proteínas (Schueler et al., 2021). Para poder indicar si el compuesto tiene una acción cinética y una relación dependiente de la concentración y el tiempo. En la figura 3A y 3B se observa el efecto en material sin moler, en la figura 3C y 3D el efecto en material molido y en la figura 3E y 3F, curvas temporales a dos concentraciones del catalizador en material sin moler y molido. Las figuras muestran que la generación del reportero de nitrito sigue una forma cinética, clásica con una V_m y K_m

similar en ambas condiciones además tiene una concentración de EC_{50} similar para el material sin moler y molido e indica una relación concentración dependiente en el efecto de degradar moléculas observado por el reportero. El tiempo también es dependiente en el efecto, indicando que a concentraciones bajas para a mayor tiempo se logra incrementar la generación del reportero de nitritos usado, como indicador de la ruptura de moléculas complejas como proteínas. Estos datos nos permiten sugerir que el compuesto tiene un efecto sobre el sustrato de materia orgánica dosis y concentración dependiente y que genera cambios en forma cinética de Michaelis-Menten con k_m de 0.2 % de V/V del CaDOS.

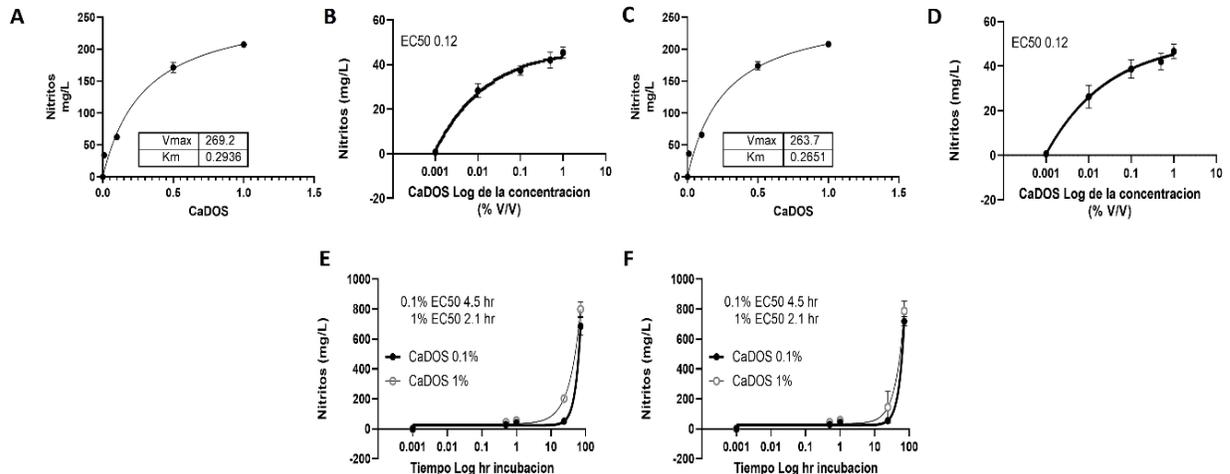


Figura 3. Estudios cinéticos, en A cinética de material sin moler, en B curva de progreso de concentración en material sin moler. en C cinética de material sin moler, en D curva de progreso de concentración en material sin moler en E curva progreso en el tiempo material sin moler, en F curva progreso en el tiempo material molido. Los puntos son promedio \pm SEM, de 3 experimentos independientes en 3 replicas

Estudios de relación masa y efecto de catalisis

Existe una relación de masa con el efecto de cualquier molécula, se plantea entonces un estudio donde se ve la relación en masa de catalizador y masa de sustrato para lograr lo efectos. En la figura 4A, observamos que hay una relación de masa efecto en generación del reportero, sin embargo se satura más a altas concentraciones, al observar el efecto a bajas concentraciones en la figura 4B, podemos ver como esta tiene una relación directamente proporcional en la figura 4C se

hace un estudio de relación masa estequiométrica, donde podemos observar que el material sin moler o molido, regresa en forma lineal con un mismo coeficiente de Pearson, indicando que al mantener la relación entre sustrato y reactante, se logra una degradación de la materia orgánica. Esta evidencia, nos permite sugerir que se puede manejar los residuos, de una forma eficiente a bajas concentraciones manteniendo una relación 1 a 1 con la masa de reactivo y sustrato.

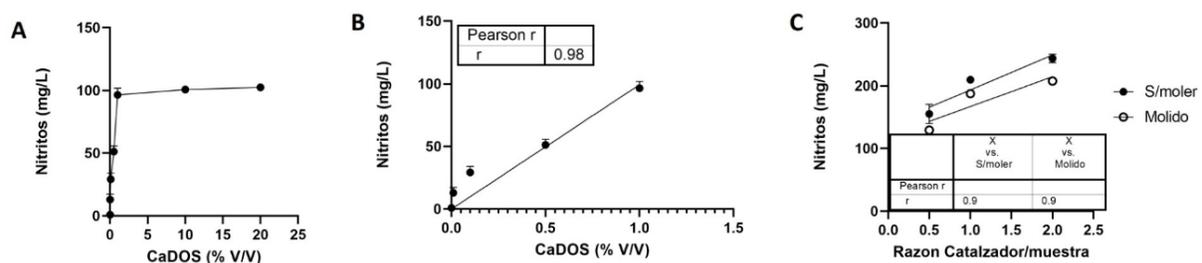


Figura 4. Estudios de relación masa y efecto, en A relación masa efecto, en B correlación entre masa y efecto de catalización y en C relación estequiométrica del material sin moler y molido. Los puntos son promedio \pm SEM, de 3 experimentos independientes en 3 replicas.

Estudios ecotoxicológicos y fitotoxicológicos

El impacto de los procesos de manejo de residuos en suelos debe ser evaluados, así como la incorporación de sustratos al suelo, para eso estudiamos los efectos del material catalizado en el suelo y en agua por la posibilidad de tener lixiviados con potencial

daño. Si bien la molécula en forma aislada ha sido estudiada en forma industrial para su registro y ha demostrado el Catalizador no tener efectos ambientales, es necesario contrastar si el material orgánico así tratado puede generar efectos en el ambiente. En la figura 5 A y 5B se ve el estudio con el uso de un bioreportero como la *D. magna* para

observar efectos ecotoxicológicos del material catalizado, en ambas figuras que corresponde a material sin moler y molido no se ve efecto en la viabilidad de los neonatos de *D. magna*. Por otro lado en la figura 6A, podemos observar imágenes del desarrollo de semillas en condiciones control o con tierra mezclada con material catalizado, en la figura 6B en la cuantificación de curvas de crecimiento en condiciones control y con material catalizado, ambas figuras no muestran cambios en desarrollo de las semillas lo que indica que el

material generado con la catálisis no altera el desarrollo de plantas, en la figura 6C, son imágenes de raíces en las condiciones de control y con material catalizado y en 6D puede observarse una cuantificación del área de desarrollo de las raíces, sin mostrar diferencias significativas. Estos datos nos dan soporte para indicar que el material tratado con el catalizador, al igual que el catalizador solo no genera alteraciones en el desarrollo de las semillas usadas en este protocolo.

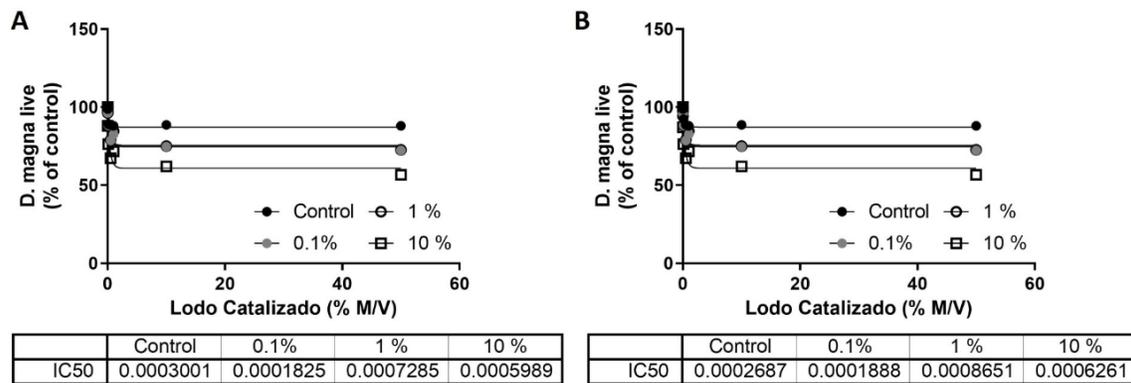


Figura 5. Estudios ecotoxicológicos, en A prueba de viabilidad de bioreportero en material sin moler catalizado, en B prueba de viabilidad de bioreportero en material molido catalizado. Los puntos son promedio \pm SEM, de 3 experimentos independientes en 3 replicas..

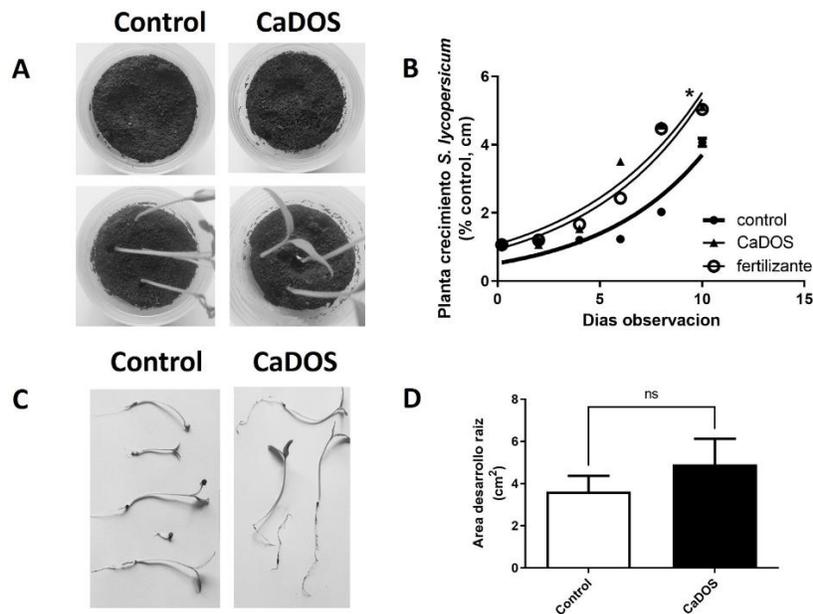


Figura 6. Estudios de fitotoxicidad, en A imagen representativa del crecimiento de plantas, en control y tierra con material catalizado, en B curva de progreso de tiempo del crecimiento de plántulas en tres condiciones. en C imagen representativa de raíces al final de la prueba de crecimiento, En D, grafico de barras representativo del área de las raíces medidas en las dos condiciones. Los puntos y barras son promedio \pm SEM, de 3 experimentos independientes en 3 replicas.

Cambios en el perfil orgánico del suelo

El perfil orgánico del suelo esta dado por la concentración de un trio de compuesto que son nitrógeno, fosfato y potasio y que se denominan NPK, por su sigla en inglés. Nos interesó saber si el material generado genera algún cambio en perfil orgánico del suelo y en especial su potencial uso en la recuperación de suelo. En las figuras 7A, 7C y 7E los cambios en las concentraciones de nitrógeno, fosforo y potasio respectivamente en tierra magra con la agregación de materia orgánica con el catalizador. En las figuras 7B, 7D y 7E,

podemos ver concentraciones de nitrógeno fosforo y potasio respectivamente, pero en suelo de tierra de hojas, rico en nutrientes con materia orgánica expuesta al catalizador. Los resultados indican que, al usar una tierra pobre en nutrientes, el material orgánico catalizado incrementa los niveles de NPK e incluso se asemejan a los valores de NPK de una tierra rica en nutrientes como la de hojas. Esto datos indican que el material orgánico de descarte, catalizado podría usarse en tierras pobres en nutrientes para incrementar la concentración de NPK.

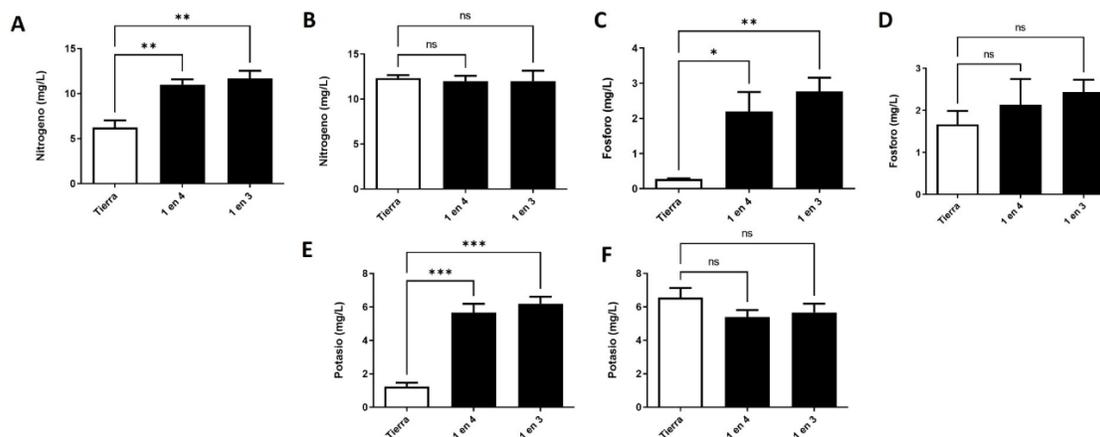


Figura 7. Valores de contenido organico en suelo. en A los valores de nitrógeno de tierra magra con material catalizado, en dos proporciones, en B valores de nitrógeno en tierra de hojas comercial más material catalizado en dos proporciones. en C los valores de fosforo de tierra magra con material catalizado, en dos proporciones, en D valores de fosforo en tierra de hojas comercial más material catalizado en dos proporciones. en E los valores de potasio de tierra magra con material catalizado, en dos proporciones, en F valores de potasio en tierra de hojas comercial más material catalizado en dos proporciones. Las barras son promedios \pm SEM de tres experimentos independientes con sus 3 replicas. El * es para un $p >$ de 0.05 indicando diferencia significativa en los promedios

Discusión

Los residuos de la industria son una molestia en general, se pierden en vertedero, no utilizándose como fuente de nutrientes y si bien las estrategias de compostar han sido integradas a estos procesos aun fallan en ser de largo tiempo, usar muchos espacios y tener volúmenes reducidos. El manejo con surfactante, ya sido demostrado ser útil en manejo de residuos industriales, como lodos de diversas fuentes (Plaza et al., 2022). Los datos generados en este estudio son una evidencia de que la materia orgánica, en un breve tiempo puede ser catalizada y ser usada como enmienda orgánica, a diferencia de lo que se ha reportado para compostera (Bao et al., 2021), En esa línea, el problema del uso de materia orgánica, es la generación de ácidos volátiles que dan olores desagradables (Zang et al., 2017), esto es secundario a la acción de bacterias anaeróbicas, que inicia el

proceso de descomposición (Griffiths et al., 2020), este proceso puede verse reducido en tiempo con las compostera, pero aun así no reduce el olor además que no se recomienda el uso de ciertas fuentes de proteínas por la atracción de vectores a las compostera (Bao et al., 2021). En nuestros resultados, el olor de este material fue totalmente controlado al usar CaDOS, lo que permite ser usado según normas ambientales en suelos no productivos, como se ve en la figura 2, sumado a esto se logró la liberación de biocompuestos esenciales para la recuperación de suelo, como diversas fuentes de nitrógeno y de minerales. Esta liberación la hace en forma dosis y tiempo dependiente, siguiendo una cinética de tipo Michaelis-Menten, con una estequiometria de 1 a 1 con el material, estas evidencias son importantes, para indicar unos efectos tipo enzimáticos en la ruptura de macromoléculas orgánicas y

secundariamente nos permite presentar un protocolo para optimizar el uso del catalizador en pruebas industriales como podemos ver la figuras 3 y 4. En la figura 3 podemos observar que la cinética tiene un Km de 0.2%, lo que indica que concentraciones cercanas a este valor logran un efecto medio, por lo que usar valores de 0.5 al 1% de catalizador no representa una pérdida de la actividad, como se ve en la figura 3, además el tiempo de catálisis puede ser de 12 horas a estas concentraciones logrando un aumento del marcador de nitritos en los estudios como se ve en la figura 3E y 3F. Es en conjunto con los datos estequiométricos de la figura 4 nos permite presentar un protocolo de manejo de la materia orgánica que se genera de las plantas mitíldo. Un importante control es que este material logrado no tenga efectos ambientales, se pudo identificar que el material catalizado no tuvo efectos ecos toxicológicos en pruebas con sensores y que tampoco presento efectos fitotóxicos en pruebas de germinación. Esto hallazgos en conjunto indican que es posible disponer este material catalizado en suelos, sin la generación de olores como un problema de salud pública, que no produce problemas ambientales y que entrega fuentes de nitrógeno a suelo, en la figura 5 y 6 podemos ver que la materia organiza sometida al proceso de catalización no genera efetos ambientales, observados la mantención de la viabilidad de *D. magna* descrito en figura 5 y por qué no se alteró germinación o el desarrollo de raíces resumido en la figura 6D. Finalmente, se midió en suelo degradados el impacto de la incorporación de materia orgánica catalizado, para esto se mido marcadores bioquímicos descritos como materia orgánica en suelo, nitrógeno, potasio y fosforo, denominado NPK por su sigla en inglés, en la figura 7. Lo interesante fue que este perfil aumento en tierras degradadas cuando se aplicó el material catalizado y logra niveles similares a los descritos para tierra de compostaje, como se observa en la figura 7A, C y E. Sin embargo, en este tipo de tierra ya rica en nutrientes, no logra aumentar la concentración, indicando que el material catalizado genera cambios nutricionales, pero no como fertilizante, como se puede observar en figuras 7B, D y F donde el material orgánico catalizado no incrementa lo niveles de NPK en suelo ya ricos en esos mismos nutrientes. Los datos son una aproximación en el manejo de

los residuos, sin olor y permitiendo hacer recircular nutrientes en suelo, como una enmienda orgánica. Es interesante, que hemos sugerido el uso del material, como un enmienda orgánica, en Chile la norma pone énfasis en relación con la generación de olor desde los residuos usados para este fin, así mismo con una concentración de fuentes de nitrógeno, que le permitan ser usado para ciertas faenas agrícolas (Ley N° 20412/2010), según esta ley se indica Existen distintos tipos de enmiendas orgánicas, que se pueden clasificar en: orgánicos de origen animal, lodos de tratamientos y de la industria o actividades productivas. Las fuentes de estas enmiendas son: guanos (frescos y semicompostados), estabilizados, guanos fosilizados, compost, humus, abonos verdes, residuos de cultivos, residuos de madera de la industria forestal, lodos de agroindustrias o de ciudades o combinaciones de las anteriores, por lo que el uso de lodos desde fuentes industriales pueden ser utilizados, pero el olor generado y su baja disponibilidad de nutrientes, no le hacen atractivos para este uso, el sistema como se muestras en nuestros resultados, indican que es factible catalizador, reducir el olor y dejar disponible materia orgánica para plantas. Nuevos estudios, para observar el efecto en suelos degradados, esto está en línea con las políticas de economía circular declaradas por diversos organismo ministeriales (González et al., 2018) y en relación con la reducción de desechos orgánicos según la nueva ruta de economía circular en Chile (<https://economiecircular.mma.gob.cl/hoja-de-ruta/>), abre oportunidades, para el uso de residuos de este tipo de industria, residuos que solo estaban destinados a rellenos sanitarios a fuentes de materia orgánica para faenas agrícolas y poder presentar un opción de catalizar estos residuos como un enmienda orgánica a un tiempo mucho menor de lo actualmente descrito y sin producir olores como un fuentes de problema de salud pública.

Lo discutido, nos permite indicar que el compostaje aún tiene muchas evidencias que deben ser exploradas, se sigue perfeccionando y es una real solución al manejo de los residuos, pero como aún tiene mucho que aportar ser mejorado e incluso reemplazado para algunos procesos, también se ve viable. El compuesto Catalizador que

hemos comenzado a explorar tiene un desarrollo nuevo pero basado en observaciones de compuesto surfactantes similares y se ha podido ver en terreno sus efectos (Parodi et al., 2022; Plaza et al., 2022), hemos podido apoyar su descripción con estudios in vitro e in vivo, en este estudio y donde podemos verlo como una alternativa para obtener nutrientes para recuperar suelos desgastados. Si bien, no presentamos toda la evidencia experimental, esta está disponible y la podemos contrastarla con el proceso de descomposición y compostaje, mostrando que podemos desarrollar una innovación de economía circular en el proceso de compostaje y manejo de residuos orgánicos.

Agradecimientos

Los autores dan las gracias a Mares limpios por facilitar las muestras de material de mitilidos, así mismo al proyecto CORFO 23RIECLL-247407 reto de innovación, foco los lagos circulares

Referencias

Abdalla, M. A., Endo, T., Maegawa, T., Mamedov, A., & Yamanaka, N. (2020). Effectiveness of organic amendment and application thickness on properties of a sandy soil and sand stabilization. *Journal of Arid Environments*, 183, 104273.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jariden.v.2020.104273>

Al-Ghouti, M. A., Khan, M., Nasser, M. S., Al-Saad, K., & Heng, O. E. (2021). Recent advances and applications of municipal solid wastes bottom and fly ashes: Insights into sustainable management and conservation of resources. *Environmental Technology & Innovation*, 21, 101267.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101267>

Andreux, F. (1996). Chapter 2 - Humus in World Soils. In A. Piccolo (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems* (pp. 45-100). Elsevier Science B.V.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-044481516-3/50003-7>

Bao, Y., Feng, Y., Qiu, C., Zhang, J., Wang, Y., & Lin, X. (2021). Organic matter- and temperature-driven deterministic assembly processes govern bacterial community

composition and functionality during manure composting. *Waste Management*, 131, 31-40.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.05.033>

Benbow, M. E., Receveur, J. P., & Lamberti, G. A. (2020). Death and Decomposition in Aquatic Ecosystems [Review]. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8(17).
<https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00017>

Boros, G., Czeglédi, I., Erős, T., & Preiszner, B. (2020). Scavenger-driven fish carcass decomposition and phosphorus recycling: Laboratory experiments with freshwater fish and crayfish. *Freshwater Biology*, n/a(n/a).
<https://doi.org/10.1111/fwb.13576>

Canet, R., & Pomares, F. (1995). Changes in physical, chemical and physico-chemical parameters during the composting of municipal solid wastes in two plants in Valencia. *Bioresource Technology*, 51(2), 259-264.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)00132-K](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)00132-K)

Estrella-González, M. J., Jurado, M. M., Suárez-Estrella, F., López, M. J., López-González, J. A., Siles-Castellano, A., & Moreno, J. (2019). Enzymatic profiles associated with the evolution of the lignocellulosic fraction during industrial-scale composting of anthropogenic waste: Comparative analysis. *Journal of Environmental Management*, 248, 109312.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvma.2019.109312>

Ezugworie, F. N., Igbokwe, V. C., & Onwosi, C. O. (2021). Proliferation of antibiotic-resistant microorganisms and associated genes during composting: An overview of the potential impacts on public health, management and future. *Science of The Total Environment*, 784, 147191.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147191>

González, J. M., Ovalle, M. J., & Salazar, M. (2018). La economía circular como respuesta alternativa a los desafíos de la alimentación: análisis de caso para la situación de Chile. *Revista Chilena de Relaciones Internacionales*, 2(2), 94-104.

Graça, J., Murphy, B., Pentlavalli, P., Allen, C. C. R., Bird, E., Gaffney, M., Duggan, T., & Kelleher, B. (2021). Bacterium consortium drives compost stability and degradation of organic contaminants in in-vessel composting process of the mechanically separated organic fraction of municipal solid waste (MS-OFMSW). *Bioresource Technology Reports*, 13, 100621.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100621>

Griffiths, K., Krosch, M. N., & Wright, K. (2020). Variation in decomposition stages and carrion insect succession in a dry tropical climate and its effect on estimating postmortem interval. *Forensic Sciences Research*, 1-9.

<https://doi.org/10.1080/20961790.2020.1733830>

Guo, Y.-X., Chen, Q.-J., Qin, Y., Yang, Y.-R., Yang, Q.-Z., Wang, Y.-X., Cheng, Z.-a., Cao, N., & Zhang, G.-Q. (2021). Succession of the microbial communities and function prediction during short-term peach sawdust-based composting. *Bioresource Technology*, 332, 125079.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125079>

Gurusamy, N. N., Puffer, N., de Jongh, C., Rodriguez Gil, C., & Aspray, T. J. (2021). Effect of initial moisture content and sample storage duration on compost stability using the ORG0020 dynamic respiration test. *Waste Management*, 125, 215-219.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.02.048>

He, X., Han, L., & Huang, G. (2020). Analysis of regulative variables on greenhouse gas emissions and spatial pore gas concentrations with modeling during large-scale trough composting. *Journal of Cleaner Production*, 277, 124066.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124066>

Lett, L. A. (2014). Las amenazas globales, el reciclaje de residuos y el concepto de economía circular. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(1), 1-2.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70039-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70039-2)

Margaritis, M., Psarras, K., Panaretou, V., Thanos, A. G., Malamis, D., & Sotiropoulos, A. (2018). Improvement of home composting process of food waste using different minerals. *Waste Management*, 73, 87-100.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.12.009>

Pacheco-Ruiz, I., Zertuche-González, J. A., Arroyo-Ortega, E., & Valenzuela-Espinoza, E. (2004). Agricultural fertilizers as alternative culture media for biomass production of *Chondracanthus squarulosus* (Rhodophyta, Gigartinales) under semi-controlled conditions. *Aquaculture*, 240(1), 201-209.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.044>

Parodi, J., Scott, I., Chavez, V., & Vega, I. (2022). Catalysis of stranded material on beaches in Arauco, Chile: experience with stranded sardines as fertilizer with a chemical solution. *Green Technology, Resilience, and Sustainability*, 2(1).

<https://doi.org/10.1007/s44173-022-00008-w>

Pascual, J. A., García, C., & Hernandez, T. (1999). Comparison of fresh and composted organic waste in their efficacy for the improvement of arid soil quality. *Bioresource Technology*, 68(3), 255-264.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00160-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00160-6)

Plaza, T., Scott, I., Vega, I., Chavez, V., & Parodi, J. (2022). Management of industrial slurries with a chemical catalyst: generation of organic sustainable solution. *Green Technology, Resilience, and Sustainability*, 2(1).

<https://doi.org/10.1007/s44173-022-00006-y>

Rahman, M. H., Haque, K. M. S., & Khan, M. Z. H. (2021). A review on application of controlled released fertilizers influencing the sustainable agricultural production: A Cleaner production process. *Environmental Technology & Innovation*, 23, 101697.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101697>

Santos, A. F., Almeida, P. V., Alvarenga, P., Gando-Ferreira, L. M., & Quina, M. J. (2021). From wastewater to fertilizer products: Alternative paths to mitigate phosphorus demand in European countries.

Artículos

Chemosphere, 284, 131258.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131258>

Schueler, T. A., Dourado, M. L., Videira, S. S., da Cunha, C. D., & Rizzo, A. C. L. (2021). Biosolubilization of verdete: An alternative potassium source for agriculture fertilizer. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 34, 102031.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102031>

Selvam, A., Wang, X., & Wong, J. (2021). Chapter Five - Food Waste Composting: Challenges and Possible Approaches. In J. Wong, G. Kaur, M. Taherzadeh, A. Pandey, & K. Lasaridi (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 137-162). Elsevier.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819148-4.00005-1>

Stewart-Wade, S. M. (2020). Efficacy of organic amendments used in containerized plant production: Part 1 – Compost-based amendments. *Scientia Horticulturae*, 266, 108856.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108856>

Wang, X., Selvam, A., Chan, M., & Wong, J. W. C. (2013). Nitrogen conservation and acidity control during food wastes composting through struvite formation. *Bioresource Technology*, 147, 17-22.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.060>

Wong, J. W. C., Fung, S. O., & Selvam, A. (2009). Coal fly ash and lime addition enhances the rate and efficiency of decomposition of food waste during composting. *Bioresource Technology*, 100(13), 3324-3331.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.063>

Xie, D., Gao, M., Yang, M., Xu, M., Meng, J., Wu, C., Wang, Q., Liu, S., & Sun, X. (2021). Composting—a solution of eliminating a nitrite-rich wastewater by reusing it as a moisture conditioning agent. *Chemosphere*, 284, 131365.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131365>

Xu, Z., Ma, Y., Zhang, L., Han, Y., Yuan, J., Li, G., & Luo, W. (2021). Relating bacterial dynamics and functions to gaseous emissions during composting of kitchen and garden wastes. *Science of The Total Environment*, 767, 144210.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144210>

Zang, B., Li, S., Michel, F. C., Li, G., Zhang, D., & Li, Y. (2017). Control of dimethyl sulfide and dimethyl disulfide odors during pig manure composting using nitrogen amendment. *Bioresource Technology*, 224, 419-427.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.023>

Zhang, M.-j., Jia, J.-q., Lu, H., Feng, M.-c., & Yang, W.-d. (2021). Functional diversity of soil microbial communities in response to supplementing 50% of the mineral N fertilizer with organic fertilizer in an oat field. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(8), 2255-2264.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63331-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63331-7)

Correlación de variables operativas y nutrientes del medio de cultivo en la biodegradación de plumas de pollo

Roberto González-Reyes*¹, Maribel Quezada-Cruz², Maribel Baltazar-Quezada², Samuel García-Hernández³

¹ Consejo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Hidalgo. Edificio Ciencia, Exhacienda de la Concepción 3, 42162 La Concepción, Hgo.

² Universidad Tecnológica de Tecámac, División Química Biológicas. Carretera Federal México - Pachuca, KM 37.5 ; Colonia: Sierra Hermosa, Tecámac, Estado de México. ; C.P. 55740.

³ Universidad Tecnológica de Tecámac, División Económico Administrativas. Carretera Federal México - Pachuca, KM 37.5 ; Colonia: Sierra Hermosa, Tecámac, Estado de México. ; C.P. 55740.
zerj_000@hotmail.com

Resumen

La bioconversión de residuos de queratina de plumas de pollo en productos de alto valor agregado es un concepto “verde” de la industria sostenible; consiste en la degradación microbiana de plumas de pollo a través de enzimas queratinolíticas producidas por bacterias, hongos y consorcios microbianos, que aumentan la disponibilidad de queratina. Aquí se reportan análisis de estimación lineal no paramétrica para variables operativas y de nutrientes del medio de cultivo en relación con la actividad queratinolítica como una respuesta del nivel de degradación de las plumas de pollo, de referencias bibliográficas reportadas. Se obtuvo un análisis de ponderación del bioproceso de degradación de plumas de pollo y un análisis correlacional para seleccionar variables de observación durante el escalamiento. Se determinó la ecuación lineal para la actividad queratinolítica: $AE^* = 949.92 + 7,231.255 \text{ fuente de calcio} + 63.633 \text{ neutralizador de pH} + 41.585 \text{ primera fuente de nitrógeno} - 29.952 \text{ temperatura} - 1.554 \text{ tiempo de degradación}$, que describe el 86.1% de la actividad queratinolítica en la degradación de plumas de pollo. Además, a través de coeficientes de Rho de Spearman con moderada correlación, se encontró que la velocidad de agitación, concentración de fuente de calcio, el neutralizador de pH, los pasos de pretratamiento, tiempo de degradación, concentración de la primera fuente de nitrógeno y temperatura, generan altos niveles de actividad queratinolítica y degradación de plumas de pollo, por lo que tienen potencial para utilizarse como variables de observación a escalas de producción industriales.

Palabras Claves: escalamiento, actividad queratinolítica, biodegradación, Rho Spearman

Abstract

The bioconversion of keratin waste from chicken feathers into high value-added products is a “green” concept of sustainable industry. Here, non-parametric linear estimation analyses are reported for operational and nutrient variables of the culture medium in relation to keratinolytic activity, from reported bibliographic references. A weighting analysis of the chicken feather degradation bioprocess and a correlational analysis were obtained to select observation variables during scaling. The linear equation for keratinolytic activity was determined: $AE^* = 949.92 + 7,231,255 \text{ calcium source} + 63,633 \text{ pH neutralizer} + 41,585 \text{ first nitrogen source} - 29,952 \text{ temperature} - 1,554 \text{ degradation time}$, which describes 86.1% of the keratinolytic activity in the degradation of chicken feathers. Additionally, through Spearman's Rho coefficients with moderate correlation, it was found that the stirring speed, concentration of calcium source, pH neutralizer, pretreatment steps, degradation time, concentration of the first nitrogen source and temperature, generate high levels of keratinolytic activity and degradation of chicken feathers, so they have the potential to be used as observation variables at industrial production scales.

Key Words: scaling, keratinolytic activity, biodegradation, Rho Spearman

Introducción

Las plumas de pollo se acumulan en los procesos avícolas y se producen en millones de toneladas al año (Demir et al., 2015), al ser desechadas en el ambiente provocan problemas de salud pública como clorosis y micoplasmosis (Embaby et al., 2015). Las plumas de pollo con residuos de sangre son un sustrato para el fácil crecimiento de diversos microorganismos patógenos como el virus H5N1 (Dhiva et al., 2020).

Las plumas de pollo están constituidas por más del 90% de proteína, siendo el componente principal la beta-queratina, una proteína estructural fibrosa (Kani et al., 2012), con un alto contenido de azufre (Lai et al., 2023), es insoluble y ampliamente entrecruzada por enlaces disulfuro que las hace estables y resistentes a la degradación (Bohacz, 2017). En comparación con las proteínas solubles, las queratinas exhiben una alta estabilidad mecánica y son resistentes a la hidrólisis por enzimas proteolíticas (tripsina, pepsina y papaína) (Bagewadi et al., 2018) debido a esta estabilidad la queratina está asociada con problemas al momento de su eliminación como residuo agroindustrial. El tercer polímero más abundante en la naturaleza es la queratina (después de la celulosa y la quitina), que por ser recalcitrante funciona como una cubierta protectora en animales y humanos (Lai et al., 2023), también es un componente importante del pelo, cuernos, pezuñas, uñas, garras y lana (Bagewadi et al., 2018).

En los últimos años, la bioconversión de residuos de queratina de plumas de pollo en productos valiosos es un concepto “verde” en la industria sostenible, en comparación con los tratamientos fisicoquímicos (Lai et al., 2023). La estructura bioquímica de las beta-queratinas reforzada por numerosos enlaces disulfuro, pueden ser degradadas mediante bacterias (Demir et al., 2015; Embaby et al., 2015; Yusuf et al., 2016; Anand et al., 2016; Jankiewicz & Frank, 2017; Dhiva et al., 2020; Ouertani et al., 2020; Nnolim et al., 2020; De Toni et al., 2002; Ezenwali, 2022; Lai et al., 2023), hongos (Liang et al., 2011; Paul et al., 2013; Bagewadi et al., 2018) y consorcios integrados por diversos microorganismos (Pahua-Ramos et al., 2017a; Bohacz, 2017; Peng et al., 2019), las evidencias demuestran que son el sistema de tratamiento más

económico y respetuoso con el medio ambiente (Lai et al., 2023). Las enzimas queratinolíticas presentes en el proceso de degradación de las plumas podrían usarse para la producción de detergentes (Ghaffar et al., 2018), algunos cosméticos y fármacos (Chaturvedi et al., 2021). Además, los productos digeridos podrían ser un material para producir alimentos para animales, fertilizantes o gas natural (Kani et al., 2012), suplemento proteico de alta calidad (Lai et al., 2023), piensos o forraje, hidrolizados que funcionan como promotores de crecimiento (Sun et al., 2020; Kaur et al., 2021;) o un buen fertilizante nitrogenado para el crecimiento microbiano (Dhiva et al., 2020).

Los estudios enfocados en la producción de enzimas queratinolíticas se basan en la capacidad de agentes microbianos para la degradación de sustratos con altos contenidos de queratina, en dichos estudios se utilizan diseños experimentales principalmente de tipo Box-Behnken (Govarathan et al., 2014), Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) (Nnolim et al., 2020), Plackett-Burman (Demir et al., 2015), Diseño compuesto central (CCD) (Yusuf et al., 2016), Experimento de un solo factor (Liang et al., 2011), Análisis canónico y cresta ascendente más pronunciada y Factorial 3^2 (Embaby et al., 2015) para la optimización de la degradación de plumas de pollo y principalmente la producción enzimática. Se distinguen dos grandes conjuntos de datos en términos de la optimización, las variables relacionadas con las condiciones de operación tales como pH, temperatura, tiempo de degradación, velocidad de agitación, entre otros y las variables relacionadas con el tipo de nutrientes en el medio de cultivo.

La revisión de datos de artículos publicados ha sido una práctica frecuente en la búsqueda del estado del arte sobre degradación de plumas de pollo con agentes microbianos, centrados en la identificación de bacterias y enzima que degradadores (Shih, 1993), los métodos biológicos y fisicoquímicos para degradación (Pahua-Ramos et al., 2017b), la caracterización de queratinasas, los métodos moleculares para identificar especies degradadoras (Kowalczyk et al., 2018), los mecanismos involucrados en la descomposición microbiana de la queratina (Peng et al., 2019), el potencial para

bioconvertir las plumas en biofertilizantes y alimentos para animales (Li, 2019), así como las diversas fuentes de queratina a partir de los desechos orgánicos (Maurya & Singh, 2024); dejando fuera un análisis sistemático sobre la relación entre las variables de operación y los nutrientes del medio de cultivo con la biodegradación de las plumas de pollo.

Adicionalmente, el escalamiento de los procesos de fermentación son un problema complejo para la industria biotecnológica, debido a las interacciones entre las condiciones operativas, como la agitación y aireación, viscosidad y la concentración de oxígeno disuelto, así como el crecimiento, producción, tipo y cantidad de enzimas de los microorganismos. Otros factores contribuyentes son la naturaleza no lineal de las interacciones de la red bioquímica y, en algunos casos, el conocimiento incompleto sobre la cinética involucrada en dichos sistemas (Rendón-Castrillón et al., 2021).

Los cambios en la velocidad de los procesos de transporte (calor, masa y momento), se ven afectados fuertemente y constituyen uno de los mayores problemas en el escalamiento (Nielse et al., 2003). Sin embargo, los análisis de regresión lineal de las variables de operación y el contenido de los medios de cultivo podrían proporcionar información útil para el escalamiento de un bioproceso. En el presente estudio se determinó la correlación que existe entre la actividad queratinolítica generada durante la biodegradación de plumas de pollo, con respecto a las variables de operación y los

nutrientes del medio de cultivo, para ponderar su importancia en el bioproceso.

Materiales y Métodos

Selección de variables

Se realizó una selección de referencias bibliográficas sobre el proceso de degradación de plumas de pollo utilizando las palabras clave de optimización, degradación de plumas de pollo y actividad queratinolítica. Se llevó a cabo la extracción de datos, se homogenizaron respecto a sus unidades, las variables cualitativas se convirtieron en valores numéricos y los conjuntos de variables se agruparon en dos categorías 1) variables de operación: pasos de pretratamiento de las plumas; número de nutrientes del medio de cultivo, número de fuentes de carbono, nivel de degradación de las plumas de pollo (%), pH, temperatura (°C), tiempo de degradación (días), tipo de microorganismo (1 para bacterias, 2 para hongos), concentración del inóculo (células/l), velocidad de agitación (rpm), volumen del experimento (l), concentración de la principal fuente de carbono (g/l), contenido de proteína soluble total (mg/ml) y actividad queratinolítica (U/ml). 2) Nutrientes del medio de cultivo (g/l) (Tabla 1): fuente de carbono adicional, estimulador de crecimiento, primera fuente de nitrógeno, segunda fuente de nitrógeno, primera fuente de fósforo, segunda fuente de fósforo, primera fuente de azufre, segunda fuente de azufre, fuente de calcio, neutralizador de pH, fuente de hierro, fuente de magnesio, fuente de sodio y regulador de crecimiento.

Tabla 1. Clasificación de los nutrientes del medio de cultivo para degradación de plumas de pollo.

Componente	1	2	3	4	5
Fuentes de carbono adicionales	Suero lácteo	Glucosa	Glicerol	Xilosa	Sacarosa
Estimulador de crecimiento microbiano	Leche desnatada	Extracto de levadura			
Primera fuente de nitrógeno	NH ₄ HCO ₃	NH ₄ Cl	Peptona	Urea	
Segunda fuente de nitrógeno	Urea	Peptona			
Primera fuente de fósforo	K ₂ HPO ₄	NaH ₂ PO ₄			
Segunda fuente de fósforo	KH ₂ PO ₄	K ₂ H ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄		
Primera fuente de azufre	MgSO ₄				
Segunda fuente de azufre	ZnSO ₄				
Fuente de Calcio	CaCl ₂				
Neutralizador de pH	CaCO ₃				
Fuente de Hierro	FeSO ₄	FeCl ₃			
Fuente de Magnesio	MgCl ₂				
Fuente de sodio	NaCl				
Regulador de crecimiento	Citrato Trisódico Dihidratado				

Se buscó la correlación entre las variables de operación respecto a la actividad queratinolítica y de la misma manera, entre los nutrientes del medio de cultivo con la actividad queratinolítica. En general, para todos los estudios consultados, la actividad queratinolítica se determinó mediante método espectrofotométrico con cinco compuestos diferentes para la generación de color: P-nitroanilida, tirosina, queratina azul, azoqueratina y péptido de extinción intramolecular, con un mayor uso de queratina azul. La actividad queratinolítica se midió a las longitudes de onda de 280, 320, 405, 440, 590, 595 y 660 nm, con uso de mayor frecuencia en 280 nm.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de normalidad en la distribución de los datos de las variables de operación y de los nutrientes del medio de cultivo. Para conjuntos de datos en los cuales el número de observaciones fue menor a 50, se usó la prueba de normalidad de Sapiro-Wilk. Si el valor de la significancia era mayor al 5% entonces se aceptaba la hipótesis nula: los datos siguen una distribución normal. Posteriormente y debido a que en todos los casos hubo al menos una variable que no cumplió la condición de distribución normal de los datos, se realizó un análisis de correlación de enfoque no paramétrico de tipo Rho de Spearman. Se identificó a la variable de actividad queratinolítica como dependiente, mientras que las variables de operación y los nutrientes del medio de cultivo se consideraron variables independientes. Las variables fueron consideradas si el valor de correlación era de moderado a muy fuerte en sentido positivo y negativo. Posteriormente, se revisó la multicolinealidad de las variables (alta correlación entre las variables predictoras). Las variables independientes en las que se dio una relación de moderada a fuerte se descartaron (Cardona et al., 2013).

Finalmente, se realizó un análisis de regresión lineal en el que se calculó el coeficiente de correlación ajustado y un análisis ANOVA con un nivel de significancia al 95%. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS Statistics versión 25.

Los valores de los coeficientes de la estimación lineal, de las variables de operación y las variables de nutrientes del medio se emplearon para construir una ecuación para predecir la actividad queratinolítica. Los valores de correlación de Rho de Spearman se utilizaron para ponderar las variables de operación y los nutrientes del medio de cultivo para un análisis integral del bioproceso.

Resultados

Extracción de información

Los pasos de pretratamiento (A) se refieren al procesamiento de las plumas de pollo previo a su degradación (Tabla 2), no incluyen la etapa de conservación ni el modo de recolección. Hubo entre uno y cinco pasos de pretratamiento de las plumas de pollo. El proceso más corto fue el lavado con agua (69.56%), el paso dos más frecuente fue el secado (57.89%), en el que se emplea la mínima temperatura para secar de 25°C (Embaby et al., 2015; Zaghloul et al., 2011) y la máxima de 80°C (Anand et al., 2016), con un promedio de 53.44°C ($\pm 14.9^\circ\text{C}$). El paso tres fue la esterilización (43.75%), seguido de la molienda de las plumas (50%) como paso cuatro y secado (50%) como paso cinco. La mayor actividad queratinolítica estuvo asociada a los procesos de pretratamiento de tres pasos, lavado, secado y esterilizado o molido (Govarathanan et al., 2014; Demir et al., 2015; Pahua-Ramos et al., 2017a; Jankiewicz & Frank, 2017; Peng et al., 2019; Nnolim et al., 2020).

Tabla 2. Valores de variables de operación en las que se determinó la actividad queratinolítica.

Referencia	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
Demir et al. (2015)	3	4	1	8	28	5.5	1	150	0.05	5	487	
Demir et al. (2015)	3	5	1	8	28	5.5	1	150	1.5	5	400	
Bagewadi et al. (2018)	4	9	2	8.5	37	10	2	120	0.05	150	67.66	
Govarathanan et al. (2014)	3	1	2	7	55	2.5	1	120	0.05	60	1075	
Paul et al. (2013)	1	6	1	6.4	30.2	3.5	1	2	150	0.05	5	54.13
Liang et al. (2011)	4	5	1	7.9	37	6	2	120	0.05	20	5.1	
Bohacz, (2017)	1	3	1	6.5	28	42	2	120	0.1	10	5.66	
Yusuf et al. (2016)	1	9	1	8	27	3	1	150	0.1	5	98	

Artículos

Referencia	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Lai et al. (2023)	4	6	1	7	37	2	1	200	0.1	10	195.05
Peng et al. 2019	3	7	2	7	30	4	1	220	0.05	50	483.4
Peng et al. 2019	3	7	2	7	30	2	1	500	1.5	50	600
Ouertani et al. (2020)	4	6	1	8	37	10	1	180	0.1	10	1.059
Nnolim et al. (2020)	3	5	2	5	25	5	1	150	0.097	10	1944
Brandelli and Riffel, (2005)	1	4	1	6	25	2	1	180	0.1	10	95
Anand et al. (2016)	2	5	1	8.5	37	5	1	120	0.1	5	81.8
De Toni et al. (2022)	1	5	1	7	30	3	1	200	0.5	10	324
Dhiva et al. (2020)	5	4	1	7	30	4	1	120	0.1	1	45
Kani et al. (2012)	5	7	1	7.5	37	30	1	120	1	1	0.884
Kani et al. (2012)	5	7	1	7.5	37	30	1	120	1	1	0.425
Jankiewicz et Frank, (2017)	3	5	1	8	28	3	1	120	1	10	8.08
Promedios	2.95	5.5	1.25	7.29	32.6	8.9	1.2	165.5	0.4	21.4	298.6

A: Pasos en el pretratamiento, B: Componentes en el medio de cultivo, C: Número de fuentes de carbono, D: pH, E: Temperatura (°C), F: Tiempo de degradación (días), G: Tipo de microorganismo, H: Velocidad de agitación (rpm), I: volumen (l), J: Concentración del sustrato (g/l) y K: Actividad queratinolítica (U/ml).

El número de nutrientes del medio (B) se refiere a la cantidad de sustancias que se usaron para evaluar la biodegradación de plumas de pollo. En promedio los medios de cultivo están conformados por 5.45 componentes. El medio de cultivo más simple fue el utilizado por Zaghoul et al. (2011) y Govarathanan et al. (2014) quienes únicamente emplearon agua destilada para la degradación de plumas de pollo. Hubo dos medios de cultivo con el número máximo de ocho sustancias (g/l): extracto de levadura (1.0), glucosa (3.0), K₂HPO₄ (1.5), MgSO₄*7H₂O (0.05), CaCl₂ (0.025), NaCl (0.5), FeSO₄*7H₂O (0.015) y ZnSO₄*7H₂O (0.005) para la biodegradación de plumas de pollo reportado por Bagewadi et al (2018). También el medio de cultivo utilizado en Yusuf et al (2016) contiene ocho componentes (g/l): NaCl (0.5), K₂HPO₄ (0.7), KH₂PO₄ (1.4), MgSO₄*6H₂O (0.001), sacarosa (5), H₂CO₃ (1.5), leche desnatada (3) y urea (0.1), estos medios de cultivo no se relacionaron con altos niveles de actividad queratinolítica (67.66 y 98 U/ml, respectivamente), en comparación con el valor promedio de 298.56 U/ml obtenido de 20 reportes bibliográficos considerados en esta parte del estudio.

El número de fuentes de carbono (C) se refiere al uso de otras fuentes de carbono adicionales a las plumas de pollo, mismas que se espera mejoren el crecimiento microbiano y/o el proceso de degradación; el 25% de los reportes consultados integró una segunda fuente de carbono más sencilla desde el punto

de vista molecular y de fácil asimilación (suero lácteo, glucosa, glicerol, xilosa y sacarosa). En algunos casos, la adición de la segunda fuente de carbono generó bajos niveles de actividad queratinolítica con respecto al promedio (298.56 U/ml); glucosa y sacarosa con valores de 98 U/ml (Bagewadi et al., 2018) y 60.89 U/ml respectivamente (Yusuf et al., 2016 y Lai et al., 2023).

Los promedios obtenidos para el pH (D), temperatura (E), tiempo de degradación (F), velocidad de agitación (H) y concentración de sustrato (J) fueron 7.29 (± 0.88), 32.6 ($\pm 6.88^\circ\text{C}$), 8.9 (± 11.27 horas), 165.5 (± 85.06 rpm) y 21.4 (± 34.92 g/l) respectivamente. El volumen de operación en general fue a nivel de laboratorio 0.37 (± 0.51 l), con algunos reportes que evaluaron la actividad queratinolítica en reactores tipo lote de 1 y 1.5 l (Kani et al., 2012; Demir et al., 2015; Jankiewicz & Frank, 2017; Peng et al., 2019). El impacto de las variables en la degradación de plumas de pollo no tiene una tendencia aparente, por lo que fue necesario realizar una regresión lineal con dichas variables para identificar el nivel de impacto en la actividad queratinolítica.

Para la variable del tipo de microorganismo (G) se asignó el valor de 1 para el caso de bacterias y el valor de 2 para cuando se trata de hongos, considerando que los hongos en general tienen un ciclo de vida y de reproducción que toma más tiempo en comparación con las bacterias, además de

que los hongos presentan mayor requerimientos nutrimentales. Los estudios de biodegradación de plumas de pollo principalmente consideran a las siguientes bacterias Gram positivas, *Bacillus* sp. Nnolim-K1 (Nnolim et al., 2020), *Bacillus* sp. MG-MASC-BT (Govarthanan et al., 2014), *Bacillus licheniformis* BBE11-1 y *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1 (Peng et al., 2019), *Streptomyces* sp. 2M21 (Demir et al., 2015), *Bacillus* sp. CN2 (Lai et al., 2023), *Bacillus halotolerans* 4BC (Ouertani et al., 2020), *Leuconostoc* sp. (Kani et al., 2012), y bacterias Gram negativas, *Alcaligenes* sp. AQ05-001 (Yusuf et al., 2016), *Xanthomonas maltophilia* (POA-1) (De Toni et al., 2002), *Chryseobacterium* sp. kr6 (Brandelli & Riffel, 2005), *Kocuria rosea* (Anand et al., 2016), *Pseudomonas aeruginosa* SU-1 (Dhiva et al., 2020), *Stenotrophomonas maltophilia* N4 (Jankiewicz & Frank, 2017b), *Pseudomonas microphilus* (Kani et al., 2012), *Alcaligenes* sp. y *Brevundimonas* sp. (Pahua-Ramos et al., 2017a), Células recombinantes de *Bacillus*

subtilis (Zaghloul et al., 2011), *Bacillus licheniformis* SHG10 (Embaby et al., 2015) y *Alcaligenes faecalis* (TPB18) (Ezenwali, 2022). Por otro lado, las especies de hongos comunes en los estudios de degradación de plumas de pollo fueron *Trichoderma harzianum* aislado HZN12 (KP235366) (Bagewadi et al., 2018), *Aspergillus fumigatus* TKF1 (Paul et al., 2013), *Aphanoascus fulvescens* y *Chrysosporium articulatum* (Bohacz, 2017) y *Myceliophthora thermophila* (Apinis) Cepa Oorschot GZUIFR-H49-1 (Liang et al., 2011).

Análisis estadístico

Estimación de la actividad queratinolítica

Del análisis estadístico se encontraron los coeficientes de correlación de Rho Spearman entre la actividad queratinolítica y las variables extraídas de los reportes bibliográficos (Tabla 3) con los valores para variables de operación contra actividad queratinolítica.

Tabla 3. Coeficientes de correlación de Rho de Spearman entre variables de operación y la actividad queratinolítica.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Pasos de pretratamiento (A)	1.000	0.258	0.062	0.274	0.539	0.389	0.112	-0.309	0.089	-0.130
Nutrientes del medio de cultivo (B)	0.258	1.000	0.194	0.309	0.214	0.096	-0.022	0.236	0.156	0.004
Número de fuentes de carbono adicionales (C)	0.062	0.194	1.000	-0.194	0.083	-0.181	0.000	0.180	-0.322	0.692
pH (D)	0.274	0.309	-0.194	1.000	0.286	0.334	0.055	-0.320	0.105	-0.111
Temperatura (E)	0.539	0.214	0.083	0.286	1.000	0.207	-0.168	-0.302	-0.166	0.135
Tiempo de degradación (F)	0.389	0.096	-0.181	0.334	0.207	1.000	-0.381	-0.528	-0.041	-0.283
Tipo de microorganismo (G)	0.112	-0.022	0.000	0.055	-0.168	-0.381	1.000	0.344	0.461	-0.268
Velocidad de agitación (H)	-0.309	0.236	0.180	-0.320	-0.302	-0.528	0.344	1.000	0.089	0.257
Volumen (I)	0.089	0.156	-0.322	0.105	-0.166	-0.041	0.461	0.089	1.000	-0.375
Concentración de fuente de carbono (J)	-0.130	0.004	0.692	-0.111	0.135	-0.283	-0.268	0.257	-0.375	1.000
Actividad queratinolítica	-0.382	-0.180	0.591	-0.248	-0.334	-0.574	0.347	0.521	-0.206	0.389

Correlación con nivel de significancia del 0.05 (95% de confianza).

Las variables de operación correlacionadas con la actividad queratinolítica a un nivel moderado fueron el número de fuentes de carbono adicionales, tiempo de degradación y la velocidad de agitación. Las variables de pasos de pretratamiento y concentración de fuente de carbono, se consideraron aunque tuvieron correlación débil. Después de revisar multicolinealidad, las variables resultantes y

que permitieron una estimación lineal respecto a la actividad queratinolítica fueron el número de fuentes de carbono adicionales y el tiempo de degradación. El coeficiente de correlación R^2 fue bajo, aún más bajo el R^2 ajustado, este último se refiere a la diferencia que existe entre los datos obtenidos de la literatura con respecto a la ecuación lineal obtenida mediante mínimos cuadrados y

asociada al número de variables que se emplean en el proceso de estimación lineal. Para el caso anterior el número de variables fue de 2, en general a mayor número de variables incrementa el valor de R^2 pero no el R^2 ajustado. El R^2 ajustado indica que el tiempo de degradación y el número de fuentes de carbono, guardan una correlación significativa con la actividad queratinolítica y representan el 39% de dicha variable, mientras que el 61% se explica con otras variables que no están integradas en el análisis. El análisis de ANOVA mostró un valor de significancia menor al 5% (0.005), por ello se puede decir que es factible construir un modelo de regresión lineal múltiple a partir de las variables dependientes y sus predictoras. El valor del coeficiente indica que a mayor número de fuentes de carbono (679.59) y menor tiempo de degradación (-6.13), es mayor la actividad queratinolítica esperada. Con los valores de los coeficientes estandarizados se puede calcular el nivel de impacto de cada variable, en este sentido el tiempo de degradación impacta 4.36 veces menos que el número de fuentes de carbono. El signo del coeficiente estandarizado o no estandarizado, indica el sentido del impacto entre las variables correlacionadas (Modelo 1, Fig. 2).

Las variables de nutrientes del medio de cultivo correlacionadas con la actividad queratinolítica a un nivel moderado fueron, la primera fuente de nitrógeno, la fuente de calcio y el neutralizador de pH, mismas que no presentan multicolinealidad, por lo que es posible una estimación lineal respecto a la actividad queratinolítica. El coeficiente de correlación R^2 ajustado (Modelo 2, Fig. 2) fue mayor al obtenido en la estimación lineal realizada con las variables de operación, aun considerando que para este caso el número de variables independientes fue de 3. El R^2 ajustado indica que el neutralizador de pH, la fuente de calcio y la primera fuente de nitrógeno guardan una correlación significativa con la actividad queratinolítica y representan el 80.5% de dicha variable, mientras que el 19.5% se explica con otras variables. El análisis de ANOVA mostró un valor de significancia menor al 5% (0.005), por ello se puede decir que es factible construir un modelo de regresión lineal múltiple a partir de las variables dependientes y sus predictoras. Con base en los valores de coeficientes del

modelo lineal estandarizados se puede decir que el mayor elemento de influencia en la actividad queratinolítica fue la fuente de calcio, seguido de las sustancias neutralizadoras de pH (3.09 veces menos) y la fuente de nitrógeno (41.90 veces menos).

En un estudio sobre los nutrientes del medio de cultivo para la etapa de degradación con la cepa H49-1 de *M. thermophila* mostró que algunas fuentes de carbono complementarias podrían promover la actividad queratinolítica, la cual aumentó a 1800 U/l después de agregar almidón soluble al medio líquido básico e incubar durante 6 días (Liang et al., 2011). Sin embargo, para otros estudios la adición de fuentes de carbono adicionales como maltosa, glicerol, sorbitol y fructosa al medio, no aumentó el nivel de actividad queratinolítica en el medio en comparación con el control (Yusuf et al., 2016).

Los porcentajes obtenidos de las 22 referencias bibliográficas revisadas, para los distintos componentes del medio de cultivo fueron: segunda fuente de nitrógeno en 95.5% (urea y peptona HM B#), regulador de crecimiento en 90.9% (citrato trisódico dihidratado), fuente de magnesio en 81.8% ($MgCl_2$), primera fuente de fósforo en 68.2% (K_2HPO_4 y NaH_2PO_4), fuente de carbono adicional en 45.5% (suero lácteo, glucosa, glicerol, xilosa y sacarosa), estimulador de crecimiento microbiano en 40.9% (leche desnatada y extracto de levadura), segunda fuente de fósforo en 40.9% (KH_2PO_4 , $K_2H_2PO_4$ y Na_2HPO_4), fuente de iones de hierro en 31.8% ($FeSO_4$ y $FeCl_3$), segunda fuente de azufre en 13.6% ($ZnSO_4$), fuente de calcio en 13.6% ($CaCl_2$ y $CaCO_3$), neutralizador de pH en 13.6% ($CaCO_3$), primera fuente de nitrógeno en 9.1% (NH_4HCO_3 , NH_4Cl , peptona y urea), primera fuente de azufre en 4.5% ($MgSO_4$) y fuente de sodio en 4.5% ($NaCl$).

El pH juega un doble rol en la actividad queratinolítica de las enzimas; éste parámetro se ve afectado durante el proceso de la hidrólisis ya que las plumas de pollo son ricas en nitrógeno y al momento de la degradación se libera nitrógeno inorgánico, lo que conduce a un aumento del pH (alcalinización), esta reacción se ha atribuido a la alta concentración de amoníaco, resultante de la desaminación de los grupos que contienen

aminoácidos que emanan de la queratina de las plumas de pollo (Nnolim et al., 2020). Sin embargo, el pH de producción no necesariamente es el pH óptimo de reacción de la enzima, se ha reportado que la actividad queratinolítica se mantuvo en 90% de su actividad cuando se expuso a un pH de 5 a 7 durante 3 h, mientras que los valores de pH bajos le confieren mayor estabilidad. A pH 9, la enzima retuvo 50% de su actividad catalítica, con actividad queratinolítica mejorada a pH 8 (Paul et al., 2013). En cepas bacterianas como *Chryseobacterium* sp. kr6 durante la degradación de plumas de pollo, los valores de pH aumentaron hasta 8.3, con una tasa máxima de producción específica alcanzada a las 24 h, la cual coincide con el final de la fase de crecimiento exponencial (Brandelli & Riffel, 2005). Para el estudio con *Alcaligenes* sp. AQ05-001 crecida en un rango de pH de 7 a 9 usando tampón fosfato, la mejor actividad queratinolítica se limitó a un pH de 7.5 a 8.5 con una degradación de las plumas del 96%. En tanto que a valores de pH extremadamente bajos y/o altos, hubo baja actividad enzimática y degradación de las plumas, mostrando que las condiciones no son favorables para su crecimiento y supervivencia (Yusuf et al., 2016). En el caso de algunos hongos como *Acipenser fulvescens* y *C. articulatum* a los 42 días de cultivo provocaron la solubilización y mineralización de las proteínas de las plumas, como lo indica la liberación de péptidos y la acumulación de $N-NH_4$ en el medio, mismos que se correlacionaron con un aumento del pH (Bohacz, 2017).

La elección del $CaCl_2$ como componente del medio de cultivo se fundamenta en varias razones. En primer lugar, el calcio es un cofactor esencial para muchas enzimas, incluidas las queratinasas, que catalizan la degradación de la queratina. La presencia de $CaCl_2$ en el medio proporciona este cofactor, lo que aumenta la eficiencia y la actividad enzimática. Además, el $CaCl_2$ puede actuar como un estabilizador de la estructura de las proteínas, facilitando la interacción entre la enzima y su sustrato, lo que conduce a una mayor eficacia en la degradación de las proteínas queratinolíticas. Las investigaciones llevadas a cabo por Liang et al. (2010) respaldan la importancia del $CaCl_2$ en el proceso de degradación de plumas de pollo. En su estudio, encontraron que, entre las

sales metálicas analizadas, el $CaCl_2$ fue la más eficaz, aumentando la actividad queratinolítica a 1600 U/l. Este aumento significativo en la actividad enzimática subraya el papel crucial del $CaCl_2$ en la potenciación de la actividad queratinolítica y la descomposición de queratina. Además, los hallazgos de Bagewadi et al. (2018) proporcionan una perspectiva adicional sobre la importancia del $CaCl_2$ en la actividad queratinolítica. En su investigación, encontraron que la producción máxima de queratinasa se alcanzó en un medio que incluía $CaCl_2$ en un nivel alto (0.005%) Esto sugiere que la presencia de $CaCl_2$ contribuye significativamente a la optimización de las condiciones de cultivo para la producción de enzimas queratinolíticas, lo que resulta en una mayor eficiencia en la degradación de queratina.

Acerca de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, se ha reportado que la adición de 1 g/l de nitrógeno elemental procedente de nitrógeno inorgánico (bicarbonato de amonio y urea) aumentó la actividad queratinolítica y velocidad de degradación de las plumas de pollo mediante *Alcaligenes* sp. AQ05-001 (Yusuf et al., 2016). Otro reporte similar aunque para el hongo *M. thermophila* GZUIFR-H49-1 indica que la urea y el tiosulfato de sodio aumentaron la actividad queratinolítica en comparación con los cultivos en medio líquido básico. Aunque, otras fuentes de nitrógeno y azufre como caseína, soja, gelatina, alanina, NH_4NO_3 y NH_4C (Son et al., 2008; Gioppo et al., 2009) inhibieron hasta cierto punto la actividad queratinolítica cuando se agregaron al medio (Liang et al., 2011). La actividad queratinolítica con la bacteria *Bacillus* sp. Nnolim-K1 no aumentó con la adición de fuentes de nitrógeno en comparación con el control (Nolim et al., 2020). Se han asociado los bajos rendimientos de actividad enzimática en medios con fuentes de nitrógeno y plumas de pollo, debido a que los microorganismos prefieren las fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables en comparación con el nitrógeno presente en las plumas de pollo, de ahí la caída en la actividad queratinolítica (Nnolim et al., 2020).

En cuanto a las variables de operación y las variables de nutrientes del medio de cultivo correlacionados con la actividad

Artículos

queratinolítica, se utilizaron 17 referencias bibliográficas que cumplieron con los elementos necesarios. Las variables con correlación moderada en la actividad queratinolítica fueron los pasos de pretratamiento, la temperatura, tiempo de degradación, la velocidad de agitación, la primera fuente de nitrógeno, la fuente de calcio y el neutralizador de pH. Aunque bajo el criterio de multicolinealidad únicamente las variables que permitieron una estimación lineal respecto a la actividad queratinolítica fueron el neutralizador de pH, la fuente de calcio, el tiempo de degradación, la temperatura y la primera fuente de nitrógeno. En comparación con los análisis estadísticos independientes de las variables de operación y los nutrientes del medio de cultivo, en el análisis integral se agregó la variable de temperatura y se eliminó el número de fuentes de carbono adicionales, demostrando que hay mayor influencia de la temperatura que por la fuente de carbono adicional, en la actividad queratinolítica cuando se incorpora al análisis estadístico a todos los nutrientes del medio de cultivo. El coeficiente de correlación R^2 ajustado fue mayor al obtenido en la estimación lineal realizada en forma independiente de las variables de operación y las variables de los nutrientes del medio de cultivo, aun considerando que para este caso el número de variables independientes fueron cinco (Modelo 3, Fig. 2). El valor del R^2 ajustado, indica que las cinco variables independientes tienen una correlación significativa con la actividad queratinolítica que representa el 86.1% de dicha variable, mientras que el 13.1% se explica con otras

variables. En la tabla 4 de ANOVA mostrada a continuación, el valor de significancia fue menor al 5% (0.005), por ello se puede decir que es factible construir un modelo de regresión lineal múltiple a partir de las variables dependientes y sus predictoras.

Con los valores obtenidos de la regresión lineal de la actividad queratinolítica con respecto a las variables de operación y de los nutrientes del medio de cultivo (Tabla 4, columna B) se obtuvo la ecuación 1 (Fig. 1), que es una importante guía en la estimación de la actividad queratinolítica durante la biodegradación de plumas de pollo, que podría resultar útil en la evaluación *a priori* de bioprocesos que se centren en la producción de la enzima queratinolítica y en donde no es posible determinar dicha actividad enzimática. Cabe mencionar que el valor de R^2 ajustado, es un buen valor considerando la diversidad de los datos en la que las condiciones y los métodos utilizados fueron diversos, tal como en el caso de la actividad queratinolítica. Incluso para reportes en donde no se determinó la actividad queratinolítica es posible estimarla con esta ecuación, tales es el caso de los reportes de Pahuá-Ramos et al. (2017a) y Embaby et al. (2015), en los que la estimación genera un valor de -4.845 y -140.619 U/ml, respectivamente, los valores negativos en la estimación lineal de la actividad queratinolítica se generan cuando ésta es menor a 20 U/ml, con base en la ecuación mostrada (Fig. 1), por lo que la actividad enzimática para ambos reportes bibliográficos de medirse habría estado por debajo de 20 U/ml.

Tabla 4. Regresión lineal de la actividad queratinolítica con respecto a las variables de operación y de los nutrientes del medio de cultivo.

Modelo	Coeficientes ^a		no	Coeficientes estandarizados	t	Sig.	95.0% intervalo de confianza para B	
	estandarizados						Límite inferior	Límite superior
	B	Desv.						
(Constante)	949.920	355.379			2.673	0.022	167.736	1732.105
Temperatura	-29.952	11.159		-0.309	-2.684	0.021	-54.514	-5.390
Tiempo de degradación	-1.554	4.154		-0.040	-0.374	0.715	-10.696	7.589
Primera fuente de nitrógeno	41.585	27.827		0.183	1.494	0.163	-19.662	102.832
Fuente de calcio	7231.255	813.438		0.882	8.890	0.000	5440.890	9021.620
Neutralizador de pH	63.633	28.253		0.230	2.252	0.046	1.449	125.818

a. Variable dependiente: Actividad queratinolítica.

AE vs AE*

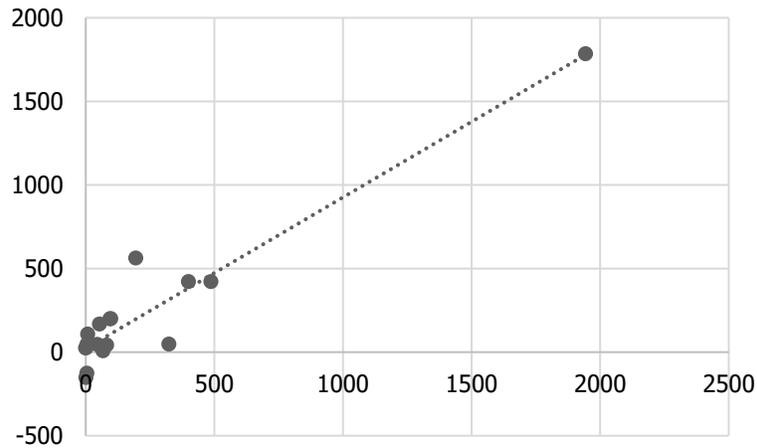


Figura 1. Distribución de datos sobre actividad queratinolítica de fuentes bibliográficas (●) y obtenidos a partir de ecuación lineal (---): actividad queratinolítica estimada (AE*) = 949.92+7231.255 fuente de calcio + 63.633 neutralizador de pH + 41.585 primera fuente de nitrógeno - 29.952 temperatura - 1.554 tiempo.

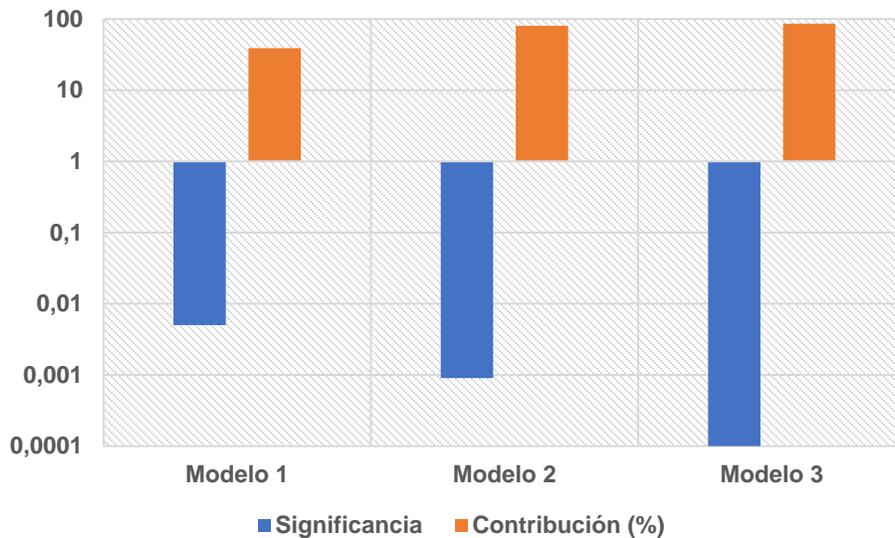


Figura 2. Resumen de resultados de regresión lineal de la actividad queratinolítica con respecto a las variables de operación y nutrientes del medio de cultivo.

Análisis integral del bioproceso

Otro resultado importante del análisis estadístico de las variables inmersas en la biodegradación de plumas de pollo fueron los valores de correlación, obtenidas mediante un método no paramétrico para correlación de Rho de Spearman, algunas de estas fueron descartadas en el apartado 3.2.1, por tener bajos valores de correlación o presentar multicolinealidad. Sin embargo, para un proceso de revisión enfocado en el escalamiento del bioproceso podrían ser relevantes (Tabla 5).

Las variables con un nivel de correlación moderada podrían ser consideradas como variables de observación durante un proceso de escalamiento por tener algún nivel de correlación representativo con la actividad queratinolítica, con la reserva de que ésta última solo describe una parte de la degradación de las plumas de pollo. Al menos 10 referencias bibliográficas utilizadas en este trabajo reportaron el porcentaje de degradación de las plumas de pollo (C1), la concentración de dicho sustrato (C2) y la actividad queratinolítica (AE). Se utilizaron

para aplicar el mismo proceso expuesto en la metodología para la estimación lineal, se observó una fuerte correlación de Rho de Spearman entre AE y C1 (0.699) y moderada correlación para AE con C2 (0.467). El valor de R^2 ajustado fue de -0.024 para AE relacionado con C1 y C2 y de 0.041 para EA relacionado con C1, lo cual indica que existe alta correlación no lineal entre la degradación de plumas de pollo y la actividad queratinolítica.

En general se podría esperar que la biodegradación de plumas de pollo este fuertemente asociada a la actividad queratinolítica, aunque diversos autores han reportado que en dicha biodegradación participan otras enzimas proteolíticas (Bohacz, 2017; Peng et al., 2019 y Kang et al., 2020). Generalmente se considera que la descomposición microbiana de la queratina se puede dividir en tres etapas: desnaturalización, degradación y transaminación (Peng et al., 2019). La degradación de la queratina de las plumas está determinada por la capacidad de los microorganismos para superar la barrera de resistencia a la hidrofobicidad (Kang et al., 2020), la compacta configuración estructural impuesta por cadenas polipeptídicas, alta reticulación (Ignatova et al., 1999) y la presencia de enlaces disulfuro (Kang et al., 2020). En lo que respecta a la ruptura de enlaces disulfuro, las teorías de la tiolisis y la hidrólisis enzimática se consideran las más razonables (Peng et al., 2019). La biodegradación de la queratina de las plumas de pollo por *A. fulvescens* y *C. articulatum* estuvo condicionada a la desaminación de los aminoácidos proteicos durante la cual se alcalinizaron los cultivos. La liberación de iones amonio se correlacionó negativamente con las actividades de la proteasa caseínolítica y la queratinolítica, lo que puede indicar que otra enzima participa en la desaminación (Bohacz, 2017). Los productos de proteólisis y amonificación de proteínas pueden inhibir la actividad proteolítica (Korniłłowicz-Kowalska, 1997). Aunque la actividad hidrolítica de las enzimas queratinolíticas sobre los monómeros de queratina es mayor que la de las proteasas ordinarias, la degradación completa de la queratina requiere la acción sinérgica de múltiples enzimas y una sola enzima queratinolítica parece tener dificultades para

hidrolizar de manera eficiente los sustratos naturales de queratina con una estructura compleja (Kang et al., 2020).

En el estudio de degradación de plumas de pollo es altamente recomendable medir la actividad queratinolítica y el porcentaje de degradación a saber, de los 26 estudios considerados en esta revisión, 46.15% cumple con este criterio.

Las variables de correlación de Rho de Spearman con nivel muy débil (Tabla 5) no impactan de manera importante en la producción de la actividad queratinolítica y en consecuencia no juegan un rol importante en la degradación de plumas de pollo. Por lo que se espera que no afecten la productividad del bioproceso a escalas superiores, tal es el caso de la primera fuente de fósforo, la segunda fuente de azufre, la primera fuente de azufre, el estimulador de crecimiento y el pH. Aunque hay que destacar que a pesar de que las variables de la segunda fuente de nitrógeno, concentración de fuente de carbono y fuente de sodio están en la categoría de correlación muy débil, son superiores en un orden de magnitud con respecto a las cinco variables antes mencionadas.

En la tabla 5, se muestran siete variables de correlación de nivel moderado, que pueden utilizarse con mayor seguridad como variables de observación durante el escalamiento del bioproceso. Debido a la correlación moderada que tienen con la actividad queratinolítica, se espera que sean las variables que puedan prever los cambios a escalas superiores de producción. En general, se esperaba que a mayor velocidad de agitación, concentración de fuente de calcio, contenido de neutralizador de pH y a menores pasos de pretratamiento, tiempo de fermentación, concentración de la primera fuente de nitrógeno y temperatura, se genere altos niveles de actividad queratinolítica y en consecuencia de degradación de plumas de pollo. Las variables con coeficientes débiles eventualmente podrían ayudar a dar seguimiento en el escalamiento del bioproceso, aunque con menor seguridad.

No hay que perder de vista que el análisis de la información considerada en este estudio es un acercamiento a la generalidad, proveniente de información con diferencias importantes

Artículos

pero que encuentran una correlación por la forma y cantidad de datos analizados. Por ello el proceso metodológico aquí empleado podría utilizarse en las investigaciones preliminares sobre un bioproceso en nuevos organismos probados, bajo condiciones de operación distintas y tipos de medio de cultivo,

con el objeto de generar diseños experimentales, esboce general de las variables implícitas en un bioproceso, identificación de variables de impacto en procesos de escalamientos, entre otras aplicaciones.

Tabla 5. Nivel de correlación Rho Spearman de variables de operación y variables de los nutrientes del medio de cultivo en la actividad queratinolítica.

Variable	Coefficiente de correlación	Nivel de correlación	Multicolinealidad positiva	Multicolinealidad negativa
Velocidad de agitación	0.571	moderada	Regulador de crecimiento	Tiempo
Fuente de calcio	0.405	moderada	Número de fuentes de carbono adicionales, Regulador de crecimiento, Fuente de carbono adicional, Segunda fuente de azufre, Concentración de fuente de carbono	NA
Neutralizador de pH	0.404	moderada	Fuente de sodio, Primera fuente de fósforo	Segunda fuente de fósforo
Número de fuentes de carbono adicionales	0.298	débil	Fuente de calcio, Segunda fuente de azufre, Concentración de fuente de carbono	Volumen
Tipo de microorganismo	0.283	débil	Volumen	Primera fuente de fósforo, Fuente de Fe y Concentración de fuente de carbono
Fuente de carbono adicional	0.232	débil	Regulador de crecimiento, Fuente de calcio, Segunda fuente de azufre y Primera fuente de azufre	NA
Regulador de crecimiento	0.204	débil	Fuente de carbono adicional, Fuente de calcio y Velocidad de agitación	NA
Segunda fuente de nitrógeno	0.144	muy débil	Estimulador de crecimiento, Primera fuente de nitrógeno, pH	NA
Concentración de fuente de carbono	0.139	muy débil	Fuente de calcio, Número de fuentes de carbono adicionales y Segunda fuente de azufre	NA
Fuente de sodio	0.130	muy débil	Neutralizador de pH	Segunda fuente de fósforo, Fuente de calcio
Primera fuente de fósforo	0.059	muy débil	Neutralizador de pH, Fuente de Fe	Tipo de microorganismo
Segunda fuente de azufre	0.000	muy débil	Número de fuentes de carbono adicionales, Fuente de Fe, Fuente de carbono adicional, Fuente de calcio, Concentración de fuente de carbono	Tipo de microorganismo
Primera fuente de azufre	-0.026	muy débil	Fuente de Fe, Fuente de carbono adicional	Tiempo, Fuente de Magnesio
Estimulador de crecimiento	-0.078	muy débil	Segunda fuente de nitrógeno, Primera fuente de nitrógeno, pH	Primera fuente de fósforo
pH	-0.087	muy débil	Estimulador de crecimiento, Segunda fuente de nitrógeno	NA
Fuente de Fe	-0.118	muy débil	Primera fuente de azufre, Segunda fuente de azufre, Primera fuente de fósforo	Tipo de microorganismo
Volumen	-0.201	débil	Tipo de microorganismo y Fuente de Magnesio	NA
Segunda fuente de fósforo	-0.265	débil	NA	Neutralizador de pH y Fuente de sodio
Fuente de Magnesio	-0.268	débil	Tiempo, Pasos de pretratamiento, Primera fuente de nitrógeno, Volumen	Primera fuente de azufre

Artículos

Variable	Coficiente de correlación	Nivel de correlación	Multicolinealidad positiva	Multicolinealidad negativa
Pasos de pretratamiento	-0.467	moderada	Temperatura, Fuente de Magnesio y Tiempo	NA
Tiempo	-0.541	moderada	Fuente de Magnesio, Pasos de pretratamiento, Primera fuente de nitrógeno	Velocidad de agitación
Primera fuente de nitrógeno	-0.561	moderada	Estimulador de crecimiento, Temperatura, Segunda fuente de nitrógeno, Fuente de Magnesio y Tiempo	NA
Temperatura	-0.567	moderada	Pasos de pretratamiento, Primera fuente de nitrógeno	NA

Conclusiones

Con base en el objetivo planteado, fue posible realizar cálculos de estimación lineal con la información publicada en literatura hasta obtener un factor de correlación ajustado aceptable en comparación con estudios semejantes, dicha correlación permitió la generación de una ecuación lineal para el cálculo de la actividad queratinolítica con base en variables de operación y los nutrientes del medio de cultivo más usuales en la biodegradación de plumas de pollo. Por otro lado, se propuso una vía para la selección de variables para el seguimiento de un escalamiento teórico del bioproceso, con base en los valores de correlación de Rho de Spearman. El método de revisión aquí propuesto es una alternativa rápida para el análisis de los reportes de literatura de algún bioproceso, del que se desee conocer la correlación de las variables involucradas con potencial para la jerarquización de las variables implícitas, que podrían funcionar como una guía en procesos de diseños experimentales y seguimiento en el escalamiento de procesos.

Agradecimientos

El presente proyecto se realizó como parte de una estancia posdoctoral, financiada por parte del Consejo de Ciencia Tecnología e Innovación de Hidalgo. De la misma manera se agradece a la Universidad Tecnológica de Tecámac por las facilidades para el trabajo que se desarrolló.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Referencias

Cardona D, González Rodríguez JL, Rivera Lozano M & Cárdenas Vallejo E (2013) Inferencia estadística Módulo de regresión lineal simple. Repositorio Institucional E-docUR. Universidad del Rosario.
https://doi.org/10.48713/10336_10447

Anand C, Mehta M, Shah G (2016) Degradation of keratin waste products by *Kocuria rosea*. National Journal of Advanced Research 2 (4), 21-22.

Bagewadi ZK, Mulla SI, Ninnekar HZ (2018) Response surface methodology based optimization of keratinase production from *Trichoderma harzianum* isolate HZN12 using chicken feather waste and its application in dehairing of hide. Journal of Environmental Chemical Engineering 6(4), 4828-4839.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.07.007>

Bohacz J, (2017) Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. World Journal of Microbiology and Biotechnology 33, 1-16.
<https://doi.org/10.1007/s11274-016-2177-2>

Brandelli, A, Riffel, A 2005 Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium* sp. growing on raw feathers. Electronic Journal of Biotechnology 8(1), 35-42.

Chaturvedi V, Agrawal K, & Verma P (2021) Chicken feathers: A treasure cove of useful metabolites and value-added products. Journal of Environmental Sustainability 4, 231-243.
<https://doi.org/10.1007/s42398-021-00160-2>

De Toni, C H, Richter MF, Chagas JR, Henriques JA, Termignoni, C 2002 Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain. Canadian Journal of Microbiology 48(4), 342-348. <https://doi.org/10.1139/w02-027>

Demir T, Hameş EE, Öncel SS, Vardar-Sukan F, 2015 An optimization approach to scale up keratinase production by *Streptomyces* sp. 2M21 by utilizing chicken feather. International Biodeterioration & Biodegradation 103, 134-140. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.025>

Dhiva S, Ranjith KR, Prajitsya P, Sona KPNarendrakumar G, Prakas, P, Samrot AV, 2020 Optimization of keratinase production using *Pseudomonas aeruginosa* Su-1 having feather as substrate. Biointerface Research in Applied Chemistry 10, 6540-6549. <https://doi.org/10.33263/BRIAC105.65406549>

Embaby AM, Marey HS, Hussein A, 2015 A statistical-mathematical model to optimize chicken feather waste bioconversion via *Bacillus licheniformis* SHG10: a low cost effective and ecologically safe approach. Journal of Bioprocessing & Biotechniques5(6), 1-14. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000231>.

Ezenwali M, 2022 Optimization, Isolation and Characterization of a keratinolytic Protease from Human Hair-Degrading Bacterium *Alcaligenes faecalis* strain TPB18. World Journal of Research and Review 15, 01-19.

Ghaffar I, Imtiaz A, Hussain A, Javid A, Jabeen F, Akmal M, Qazi JI 2018 Microbial production and industrial applications of keratinases: an overview. International Journal of Microbiology 21, 163–174. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-0022-1>.

Gioppo N, Moreira-Gasparin F, Costa A, Alexandrino A, Souza C, Peralta R 2009 Influence of the carbon and nitrogen sources on keratinase production by *Myrothecium verrucaria* in submerged and solid state cultures. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 36, 705e711. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0540-0>

Govarthanan M, Selvankumar T, Selvam K, Sudhakar C, Aroulmoji V, Kamala-Kannan S 2014 Response surface methodology based optimization of keratinase production from alkali-treated feather waste and horn waste using *Bacillus* sp. MG-MASC-BT. Industrial & Engineering Chemistry Research 27, 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.12.022>

Ignatova Z, Gousterova A, Spassov G, Nedkov P 1999 Isolation and partial characterisation of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. Canadian Journal of Microbiology 45(3), 217-222.

Jankiewicz U, Frań M 2017 Identification and properties of a keratinase from *Stenotrophomonas maltophilia* N4 with potential application in biotechnology. Ecological Questions 28, 15-24. <https://doi.org/10.1139/w98-230>

Kang E, Jin HS, La JW, Sung JY, Park SY, Kim WC, Lee DW 2020 Identification of keratinases from *Fervidobacterium islandicum* AW-1 using dynamic gene expression profiling. Microbial Biotechnology 13(2), 442-457. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13493>

Kani T P, Subha K, Madhanraj P, Senthilkumar G, Panneerselvam A 2012 Degradation of chicken feathers by *Leuconostoc* sp. and *Pseudomonas microphilus*. European Journal of Experimental Biology 2(2), 358-362.

Kaur M, Bhari R, Singh R, 2021 Chicken feather waste-derived protein hydrolysate as a potential biostimulant for cultivation of mung beans. Biology 76(6), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00724-x>

Korniłowicz-Kowalska T 1997 Studies on the decomposition of keratin wastes by saprotrophic microfungi. I. Criteria for evaluating keratinolytic activity. Acta Mycológica 32(1), 51-79.

Kowalczyk P, Mahdi-Oraibi S, Misiewicz A, Gabzdyl N, Miskiewicz A, Szparecki G 2018 Feather-degrading bacteria: their biochemical and genetic characteristics. Arabian Journal for Science and Engineering 43, 33-41.

<https://doi.org/10.1007/s13369-017-2700-2>

Lai Y, Wu X, Zheng X, Li W, Wang L 2023 Insights into the keratin efficient degradation mechanism mediated by *Bacillus* sp. CN2 based on integrating functional degradomics. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 16(59)

<https://doi.org/10.1186/s13068-023-02308-0>

Li Q 2019 Progress in microbial degradation of feather waste. *Frontiers in Microbiology* 10(2717), 1-15.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02717>.

Liang JD, Han YF, Zhang JW, DuW, LiangZQ, Li ZZ 2011 Optimal culture conditions for keratinase production by a novel thermophilic *Myceliophthora thermophila* strain GZUIFR-H49-1. *Journal of Applied Microbiology* 110(4), 871-880.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04949.x>

Maurya SD, Singh A 2024 Application and future perspectives of keratin protein extracted from waste chicken feather: A review. *Sustainable Chemical Engineering* 5(1), 32-46.

<https://doi.org/10.37256/sce.5120243521>

Nielsen J, Villadsen J, Lidén G 2003 Scale-up of bioprocesses. In: *Bioreaction Engineering Principles*. Springer, Boston, MA.

https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0767-3_11

Nnolim N E, Mpaka L, Okoh AI, Nwodo UU 2020 Biochemical and molecular characterization of a thermostable alkaline metallo-keratinase from *Bacillus* sp. Nnolim-K1. *Microorganisms* 8(9), 1304.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8091304>

Nnolim NE, Okoh AI, Nwodo UU 2020 *Bacillus* sp. FPF-1 produced keratinase with high potential for chicken feather degradation. *Molecules* 25(7).

<https://doi.org/10.3390/molecules25071505>

Ouertani R, Chouchane H, Mahjoubi M, Khdhira H, Masmoudi AS, Cherif A, Neifar M, 2020 Feather degradation efficiency and hide dehairing ability of a new keratinolytic *Bacillus halotolerans* strain, isolated from a tannery

wastewater. *MOJ Applied Bionics and Biomechanics* 4(5), 102-109.

<https://doi.org/10.15406/mojabb.2020.04.00143>

Pahua-Ramos M, Hernández-Melchor D, Camacho-Pérez B 2017a Biodegradation of Chicken Feathers by A Co-Culture of *Alcaligenes* and *Brevundimonas*. *Indian Journal of Biotechnology* 13(6), 152.

Pahua-Ramos M E, Hernández-Melchor DJ, Camacho-Pérez B, Quezada-Cruz M 2017b Degradation of chicken feathers: a review. *BioTechnology: An Indian Journal* 13(6), 1-24.

Paul T, Das A, Mandal A, Halder SK, DasMohapatra PK, Pati BR, Mondal KC 2013 Production and purification of keratinase using chicken feather bioconversion by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* TKF1: detection of valuable metabolites. *Biomass Conversion and Biorefinery* 4, 137-148.

<https://doi.org/10.1007/s13399-013-0090-6>

Peng Z, Mao X, Zhang J, Du G, Chen J 2019 Effective biodegradation of chicken feather waste by co-cultivation of keratinase producing strains. *Microbial Cell Factories* 18(1), 1-11.

<https://doi.org/10.1186/s12934-019-1134-9>

Rendón-Castrillón L, Ramírez-Carmona M, Ocampo-López C, Gómez-Arroyave L 2021 Mathematical Model for Scaling up Bioprocesses Using Experiment Design Combined with Buckingham Pi Theorem. *Applied Sciences* 11(11338), 1-17.

<https://doi.org/10.3390/app112311338>

Shih JC 1993 Recent development in poultry waste digestion and feather utilization—A review. *Poultry Science* 72(9), 1617-1620.

<https://doi.org/10.3382/ps.0721617>

Son HJ, Park HC, Kim HS & Lee CY (2008) Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis*. *Biotechnology Letters* 30, 461–465.

<https://doi.org/10.1007/s10529-007-9567-3>

Sun Z, Li X, Liu K, Chi X, Liu L 2020 Optimization for Production of a Plant Growth Promoting Agent from the Degradation of Chicken Feather Using Keratinase Producing Novel Isolate *Bacillus pumilus* JYL. *Journal of*

Artículos

Wastes and Biomass Management 12(4).
<http://dx.doi.org/10.1007/s12649-020-01138-7>

Yusuf I, Ahmad SA, Phang LY, Syed MA, Shamaan NA, Khalil KA, ShukorMY 2016 Keratinase production and biodegradation of polluted secondary chicken feather wastes by a newly isolated multi heavy metal tolerant bacterium-Alcaligenes sp. AQ05-001. Journal of Environmental Management 183, 182-195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.0599>

Zaghloul TI, Embaby AM, Elmahdy AR 2011 Biodegradation of chicken feathers waste directed by Bacillus subtilis recombinant cells: Scaling up in a laboratory scale fermentor. Bioresource Technology102(3), 2387-2393. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.106>

Identificación molecular de aislados de *Anaplasma marginale* en México mediante el gen *msp1a*

Molecular identification of *Anaplasma marginale* isolates in Mexico using the *msp1a* gene.

Elizabeth Salinas Estrella¹, Mayra Elizeth Cobaxin Cárdenas¹, Alex Sebastian Hernández Álvaro¹, Itzel Amaro Estrada¹, Jesús Francisco Preciado de la Torre¹, Sergio D. Rodríguez Camarillo¹.

¹ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera Cuernavaca-Cuatla 8534, Col. Progreso, Jiutepec, Mor. C.P. 62574.

Resumen

La anaplasmosis bovina es una enfermedad, conocida coloquialmente como vaca amarilla, que ocasiona grandes pérdidas económicas a las unidades de producción bovina en zonas donde la enfermedad es endémica, debido principalmente a la dificultad de introducir ganado mejorado en estas regiones. Esta enfermedad es causada por un patógeno del orden de los Rickettsiales que infecta los eritrocitos de los bovinos originando anemia y, con ello, disminución o pérdida de la producción de carne y leche; puede ocasionar la muerte a los animales adultos a la primoinfección y generar disminución de la capacidad reproductiva por la dificultad para eliminar la bacteria del organismo. Por ello, en los animales que sobreviven la primera infección, pueden generarse ciclos de rickettsemia que contribuyen a la dificultad de mantener al hato en buen estado de salud. En México no existen vacunas comerciales para esta enfermedad, debido a que el patógeno causante, *Anaplasma marginale*, es un organismo con una diversidad genética muy grande que produce a su vez una gran variabilidad antigénica. Se ha demostrado en el país y en el mundo que existe una gran cantidad de cepas circulantes en los hatos bovinos, mediante la caracterización molecular del gen *msp1a*, el cual codifica para una proteína de membrana con un fragmento altamente variable caracterizada por la presencia de repetidos de aminoácidos en tándem. En este trabajo se realizó la identificación molecular de diferentes aislados y se encontraron repetidos muy diversos a los anteriormente reportados en México y en el mundo.

Palabras Claves: *Biología Pecuaria, vaca amarilla, Respuesta inmune, Vacunas, Diagnóstico, Bovinos.*

Abstract

Bovine anaplasmosis is a disease that causes great economic losses to cattle production units in areas where the disease is endemic, mainly due to the difficulty of introducing improved cattle in these regions. This disease is caused by a pathogen of the Rickettsial order that infects the erythrocytes of cattle, causing anemia and, with it, a decrease or loss of meat and milk production; it can cause the death of adult animals upon primary infection and generate a decrease in reproductive capacity due to the difficulty in eliminating the bacteria from the organism. Therefore, in animals that survive the first infection, cycles of rickettsemia can be generated that contribute to the difficulty of maintaining the herd in good health. In Mexico, there are no commercial vaccines for this disease, due to the fact that the causative pathogen, *Anaplasma marginale*, is an organism with a great genetic diversity that produces a great antigenic variability. It has been demonstrated in the country and in the world that there is a great amount of circulating strains in bovine herds, through the molecular characterization of the *msp1a* gene, which codes for a membrane protein with a highly variable fragment characterized by the presence of amino acid repeats in tandem. In this work, the molecular identification of different isolates was carried out and very different repeats were found from the previous ones.

Key Words: Livestock biotechnology, yellow cow, immune response, vaccines, diagnostics, cattle

Introducción

Anaplasma marginale es una bacteria intraeritrocítica obligada, causante de la anaplasmosis bovina, una de las enfermedades de mayor prevalencia en el trópico mexicano y que afecta gravemente la producción ganadera. Su importancia se debe a las pérdidas en el área pecuaria a diferentes niveles, desde el impedimento de la importación de ganado genéticamente superior al nativo de regiones tropicales, pérdidas económicas por elevados costos de tratamiento, baja producción de carne y leche, y por la muerte, principalmente, de los animales adultos infectados en las unidades productivas (Bautista-Garfias et al., 2021; Salinas-Estrella et al., 2022).

Esta enfermedad es transmitida principalmente por garrapatas (*Rhipicephalus microplus* o *Dermacentor spp.*) (Kocan et al., 2008), las cuales representan el vector biológico de este patógeno; otra forma de transmisión son las moscas (*Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans*) (Bautista-Garfias et al., 2021) y tábanos (*Tabanus bovinus*) que actúan como vectores mecánicos; finalmente, este patógeno puede ser transmitido de forma vertical, de una hembra gestante a la cría, y de manera iatrogénica, mediante el uso de instrumental contaminado.

El cuadro clínico cursa con una anemia severa, ictericia, fiebre, pérdida de la producción de carne y leche, puede generar abortos en el tercer tercio de la gestación y, más frecuentemente en animales adultos, la muerte. Las medidas más importantes de control están enfocadas en los vectores (Amaro et al., 2020) y a la insistencia en buenas prácticas de manejo, entre las que destacan el uso de una aguja por animal, así como la limpieza y esterilización de equipo quirúrgico para evitar la diseminación de sangre contaminada entre bovinos susceptibles.

El acceso a vacunas comerciales aún no es posible en México, puesto que las vacunas usadas en otros países incluyen el uso de una cepa viva de *A. centrale* (un patógeno similar, con una patogenicidad menor) (Kocan et al., 2008), organismo exótico en el país. El diseño de vacunas que están basadas en la información genómica de los organismos

patógenos, cultivables y no cultivables *in vitro* (Cobaxin-Cárdenas et al., 2019), es una alternativa segura y eficaz para identificar los péptidos o proteínas que tienen el potencial antigénico e inmunogénico predicho para ser considerados como posibles candidatos vacunales (Guadarrama-Albarrán et al., 2024). Entre las proteínas que se han usado como blancos vacunales se encuentra MSP1a, que está codificada por el gen *msp1a* (Allred et al., 1990). El fragmento variable de esta proteína se encuentra expuesto sobre la membrana de la bacteria y se sabe que tiene propiedades de ligando o adhesina hacia un receptor aún no identificado en los eritrocitos del bovino, y células de ciertas garrapatas como *Dermacentor variabilis* e *Ixodes scapularis* (McGarey et al., 1994; Garcia-Garcia et al., 2004).

Debido a que la diversidad genética de *A. marginale* es muy amplia, es necesario continuar realizando trabajos de caracterización molecular y secuenciación genómica, con la finalidad de encontrar secuencias que sean conservadas entre cepas y que permitan el reconocimiento por el sistema inmune de forma que se pueda bloquear la infección a los eritrocitos o la replicación de los cuerpos iniciales de la bacteria (Salinas-Estrella et al., 2022).

A la fecha se tienen bajo resguardo (INIFAP-CENID SAI) 25 aislados de los cuales se han secuenciado 7 genomas. Por ello, en este trabajo se llevó a cabo la caracterización molecular de 8 aislados con base en la secuencia del gen *msp1a*, el cual ha servido anteriormente para caracterizar 17 de los aislados bajo resguardo (Jiménez-Ocampo et al., 2012).

Materiales y Métodos

A partir de sangre de bovino infectada recuperada de diferentes casos clínicos confirmados de anaplasmosis, se realizó la extracción de ADN (Favorgen®, Ping Tung, Taiwan); se corroboró su integridad en gel de agarosa al 1% y se cuantificó (NABI, Microdigital Co. Korea). Posteriormente, se llevó a cabo la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) anidado del gen *msp5* (Amaro-Estrada et al., 2020) utilizando el material genómico extraído y una mezcla de reacción comercial (PCR Master Mix, Promega®, Madison, WI, USA) para

Artículos

determinar la presencia del ADN del patógeno en cada una de las muestras. A continuación, a partir de las muestras positivas, se usaron de 5 a 10 µl de ADN (dependiendo la concentración de cada muestra) para realizar PCR punto final para la amplificación del gen *msp1a* (Jiménez-Ocampo et al., 2012).

Luego de realizar la electroforesis para la observación de los fragmentos amplificados, estos fueron cortados a partir del gel de agarosa y purificados utilizando un paquete comercial (Promega®, Wisconsin, EEUU). El ADN resultante fue cuantificado y se corroboró su integridad en gel de agarosa. Dos alícuotas de ADN de 120ng por muestra fueron enviadas a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM, Cuernavaca).

Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando las plataformas BioEdit® Sequence Alignment Editor; después de obtener la secuencia consenso se realizaron alineamientos con la secuencia de la cepa St.

Maries (>AF293062.1, NCBI) utilizando Clustal Omega®, y posteriormente, cada una de las secuencias de los aislados fueron traducidas a proteína (Emboss Transeq) para identificar secuencias aminoacídicas de repetidos utilizando la plataforma en línea Tandem Repeat Finder®.

Resultados

Se obtuvieron 13 muestras de ADN aislados provenientes de diferentes lugares de la México, localizados en zonas enzoóticas de anaplasmosis, de acuerdo con Rodríguez et al., (2009), que tienen las condiciones climáticas para permitir la supervivencia de los vectores biológicos y por ende el mantenimiento de diferentes cepas de *A. marginale* en los hatos bovinos. De esas 13 muestras, 8 se pudieron analizar por PCR y secuenciación. El patrón de bandas del amplicón resultante de la PCR para el gen *msp1a* fue diferente para cada aislado, observando bandas desde 500 pb hasta 900 pb (Figura 1).

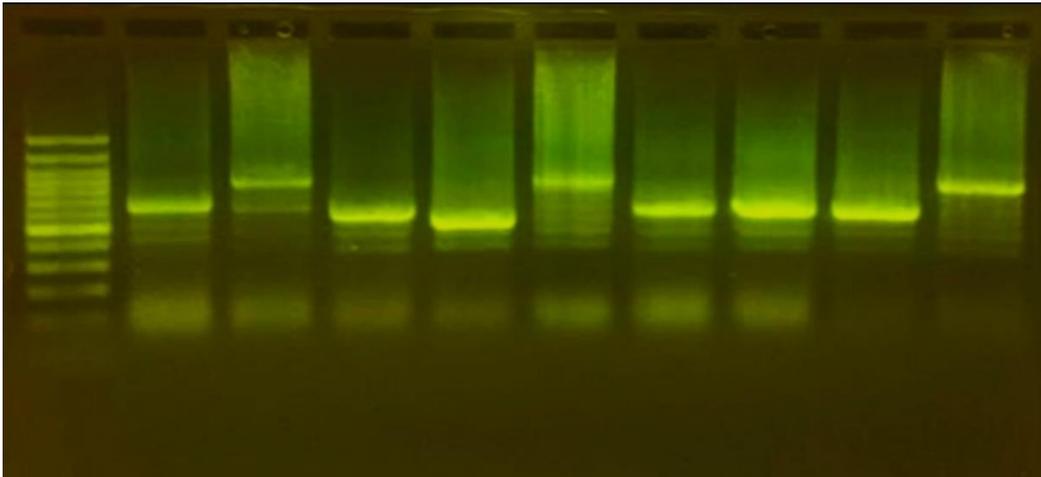


Figura 1. Resultados de electroforesis de los DNA amplificados (PCR). Carril 1 Marcador de tamaño molecular (1kb, PROMEGA). Carril 2: Palenque. Carril 3: Yucatán. Carril 4: Mapastepec. Carril 5: Ticul. Carril 6: Tepic. Carril 7: Guyaboso. Carril 8: SLM Zamora. Carril 9: Jalisco. Carril 10: Control positivo Tizimín.

Los análisis de las secuencias de ADN revelaron la presencia de 29 repetidos diferentes, de los cuales no hay ningún repetido que coincida con los reportados anteriormente por De la Fuente et al., (2007) o por Jiménez-Ocampo et al., (2012), esto puede explicarse principalmente por dos razones: 1) que los amplicones secuenciados en este trabajo son muy diferentes a los anteriormente reportados en México; o 2) que la purificación del ADN producto de la PCR (a

partir de gel) sea menos eficiente que las técnicas empleadas en otros trabajos (Jiménez-Ocampo et al., 2012) por lo que el material resulte menos óptimo para la secuenciación y debido a esto los resultados obtenidos sean tan diferentes.

De los repetidos encontrados se observó 1 repetido con longitud de 20 aa, 2 repetidos de 27 aa, 2 de 28 aa, 13 de 29 aa, 5 de 30 aa, 2 de 31 aa y 4 de 32 aa. Estos resultados

Artículos

concuerdan con lo reportado para la proteína MSP1a, la cual se conforma de un dominio conservado y un dominio variable compuesto de uno o varios polipéptidos, conocidos como repeticiones, cada uno de 23 a 31 aminoácidos, muy parecidos, y de los que se

pueden encontrar hasta 11 secuencias en tándem que pueden ser iguales o diferentes (Allred et al, 1990). El patrón de repetidos de cada aislado analizado se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Patrón de repetidos en tándem de la proteína MSP1a por cada aislado

Estado	Aislado	Patrón de repetidos					
Chiapas	Palenque	1	2	2	3	3.5	
	Mapastepec	4	4	5	6		
Jalisco	Jalisco	7	7	8	9		
Nayarit	Tepic	10	11	12	11	13	14
Tamaulipas	Guayaboso	15	16	17	18		
	Zamora	19	20	19	21		
Yucatán	Ticul	22	23	24			
	Yucatán	25	26	27	27	26	27

Asimismo, se encontraron conjuntos o motivos de aminoácidos que coincidían entre los repetidos de los diferentes aislados, los

cuales se muestran a continuación (Figura 2, agrupados por color).

	Identificación de repetidos	Secuencia	Aminoácidos por repetido																														# de AA por repetido				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		31	32		
De la Fuente 2007	A	DDSSASGQQEESVSSQSE-ASTSSQLG-	D	D	S	S	S	A	S	G	Q	Q	E	S	S	V	S	S	Q	S	E	-	A	S	T	S	S	Q	L	G	-	29					
Chiapas	Palenque	1	EWCVISKWSGQYIVSIRN**LVSG*SAARE	E	W	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	N	**	L	V	S	G	*	S	A	A	R	E	30				
		2	WCVISKWSGQYIVSIRN**LVSG*SAARE	W	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	N	**	L	V	S	G	*	S	A	A	R	E	29					
		2	WCVISKWSGQYIVSIRN**LVSG*SAARE	W	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	N	**	L	V	S	G	*	S	A	A	R	E	29					
	Mapastepec	3	WCVISKWSGQYIVSIRD**LVSEWSAARE*	W	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	D	**	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	30				
		3.5	CVISKWSGQYIVSIRS*CAA	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	S	*	C	A	A	20													
		4	*LVSEWSAARE*CVISKWSGQYIVSIRSW	*	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	S	W	27				
Jalisco	Jalisco	4	*LVSEWSAARE*CVISKWSGQYIVSIRSW	*	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	S	W	27				
		5	*LVSEWSAARE*CVISK*SQYIVSIRKL	*	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	K	L	27					
	Tepic	6	LIARQRVVSSKRVVCYLKVVRPVHRLN*D*CR	L	I	A	R	Q	R	V	V	S	S	K	R	V	V	C	Y	L	K	V	V	R	P	V	H	R	L	N	*	D	*	C	R	29	
		7	LVSEWSAARE*CVISK*SQYIVSIRD**	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	D	**	29						
Nayarit	Tepic	7	LVSEWSAARE*CVISK*SQYIVSIRD**	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	D	**	29						
		8	LVSEWSAARE*CVISK*SQYIVSIRD**	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	D	**	29						
		9	LVSEWSAARE*CVISK*SQYIVSIRTKL	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	T	K	L	29					
	Guayaboso	10	*LVREWSAARE*CVISKWSGQYIVSMN**	*	L	V	R	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	M	N	**	30					
		11	LVSE*SAAREQCVISKWSGQYIVSIRS**	L	V	S	E	*	S	A	A	R	E	Q	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	S	**	29					
		12	LVREWSAARE*CVISKWSGQYIVSIRN**	L	V	R	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	N	**	29					
Tamaulipas	Zamora	11	LVSE*SAAREQCVISKWSGQYIVSIRS**	L	V	S	E	*	S	A	A	R	E	Q	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	S	**	29					
		13	LVSEWSAAREQCVISKWSGQYIVSIRG**	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	Q	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	G	**	29					
	Ticul	14	LVSEWSAAREQCVISKWSGQYIVSTRS*LAAX	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	Q	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	T	R	S	*	L	A	A	X	32	
		15	N**LVSEWSAARE*CVISKWSGQYIVSIRS**	N	**	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	S	**	32			
Yucatán	Yucatán	16	LVSEWSAARE*CVISKWSGQYIVSIRN**	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	N	**	28					
		17	*LVSEWSAARE*CVISK*SQYIVSIRN**	*	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	N	**	30					
		18	LVSEWSAARE*CVISK*SQYIVSIRT*	L	V	S	E	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	T	*	28						
	Ticul	19	LIARQRVVSSKRVVCYLKVVRPVHRLN*E	L	I	A	R	Q	R	V	V	S	S	K	R	V	V	C	Y	L	K	V	V	R	P	V	H	R	L	N	*	E	29				
		20	LIARQRVVSSKRVVCYLKVVRPVHRLN*E	L	I	A	R	Q	R	V	V	S	S	K	R	V	V	C	Y	L	K	V	V	R	P	V	H	R	L	N	*	E	29				
		19	LIARQRVVSSKRVVCYLKVVRPVHRLN*E	L	I	A	R	Q	R	V	V	S	S	K	R	V	V	C	Y	L	K	V	V	R	P	V	H	R	L	N	*	E	29				
Yucatán	Yucatán	21	LIARQRVVSSKRVVCYLKVVRPVHRLN*GLV	L	I	A	R	Q	R	V	V	S	S	K	R	V	V	C	Y	L	K	V	V	R	P	V	H	R	L	N	*	G	L	V	31		
		22	LIARQRVVSSKRVVCHLKVVRPVHRLN*E	L	I	A	R	Q	R	V	V	S	S	K	R	V	V	C	H	L	K	V	V	R	P	V	H	R	L	N	*	E	29				
		23	LIARQRVVSSKRVVCHLKVVRPVHRLN*E	L	I	A	R	Q	R	V	V	S	S	K	R	V	V	C	H	L	K	V	V	R	P	V	H	R	L	N	*	E	29				
	Yucatán	Ticul	24	LIARQRVVSSKRVVCHLKVVRPVHRLN*GLMR	L	I	A	R	Q	R	V	V	S	S	K	R	V	V	C	H	L	K	V	V	R	P	V	H	R	L	N	*	G	L	M	R	32
			25	SW*LVTVGWSAARE*RVISK*SGQYIVSTRS**	S	W	*	L	V	T	V	G	W	S	A	A	R	E	*	R	V	I	S	K	*	S	G	Q	Y	I	V	S	T	R	S	**	32
		Yucatán	26	LVSGWSAARE*CVISKWSGQYIVSIRS**	L	V	S	G	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	S	**	29				
			27	LVSGWSAARE*CVISK*SQYIVSIRS**	L	V	S	G	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	S	**	29					
			27	LVSGWSAARE*CVISK*SQYIVSIRS**	L	V	S	G	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	S	**	29					
Yucatán	26	LVSGWSAARE*CVISKWSGQYIVSIRS**	L	V	S	G	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	S	**	29						
	27	LVSGWSAARE*CVISK*SQYIVSIRS**	L	V	S	G	W	S	A	A	R	E	*	C	V	I	S	K	*	S	Q	Y	I	V	S	I	R	S	**	29							
	28	LVSGWSAA*E*CVISKWSGQYIVSIRD*LX	L	V	S	G	W	S	A	A	*	E	*	C	V	I	S	K	W	S	G	Q	Y	I	V	S	I	R	D	*	L	X	30				

Figura 2. Análisis de las secuencias de repetidos de aminoácidos encontradas por el programa Tandem Repeat Finder.

A pesar de no coincidir con los repetidos ya publicados en la literatura, se observa la permanencia del motivo SGQ (Serina, Glicina, Glutamina) localizado en las posiciones 7, 8 y 9 (Figura 17) del repetido A (De la Fuente et al., 2007) en todos los repetidos encontrados de cinco aislados (Palenque, Yucatán, Tepic, Guayaboso y Jalisco), aunque en posiciones diferentes (la más común 18, 19 y 20). Mientras que en el aislado Zamora, solamente el primer y tercer repetido presentan la Glutamina (Q), en la posición 18, y en los repetidos 2 y 4 de este aislado, este motivo de tres aminoácidos (SGQ) se encuentra ausente tal como en los repetidos del aislado Ticul, los cuales comparten, en su lugar, la mayor parte del segundo repetido del aislado Zamora: LIARQRVVSSKRVCYLKVVVRPVHRLN*E con ligeras modificaciones: en Ticul, la Tirosina (Y) cambia por Histidina (H) y los últimos aminoácidos después de la Asparagina (N) son diferentes en los tres repetidos del aislado Ticul. Asimismo, el segundo repetido del aislado Zamora, mencionado arriba es muy similar al cuarto repetido encontrado en el aislado Mapastepec, salvo por la ausencia de la Leucina (L) inicial y la diferencia en los aminoácidos finales después de la Asparagina.

Estudios de caracterización molecular de aislados geográficos de *A. marginale* usando el gen *msp1a*, demuestran alta diversidad, misma que se observa en los resultados aquí obtenidos, lo cual reafirma la estrecha relación entre los procesos de adaptación natural y la presión ejercida sobre la bacteria *A. marginale* con la movilización del ganado para su comercialización (De la Fuente et al., 2004; 2007). Esta diversidad, observada a su vez en la proteína es importante, ya que afecta de manera directa el diseño y desarrollo de inmunógenos que pudieran tener un amplio espectro en la protección ofrecida contra esta enfermedad (De la Fuente et al., 2002; Salinas-Estrella et al., 2022).

Conclusiones

Mediante el uso de biología molecular y bioinformática, se llevó a cabo la caracterización molecular de 8 aislados de *A. marginale*, en los cuales se encontraron de 3 a 7 diferentes patrones de repetidos aminoacídicos para cada aislado, en cuyas secuencias se observaron algunos motivos de

aminoácidos coincidentes entre aislados. Resulta interesante lo reportado en este trabajo, ya que se encontraron nuevos hallazgos respecto a la diversidad genética de *A. marginale* en México, lo cual resalta la importancia de la caracterización molecular de los diferentes aislados, debido a que la diversidad genética es uno de los principales obstáculos en la generación de una vacuna eficiente contra la anaplasmosis bovina en México.

Agradecimientos

Banco de Germoplasma, Unidad de Anaplasmosis, CENID-SAI INIFAP. Proyecto Fiscal 1162734713.

Referencias

Albarrán, C. F. G., Estrella, E. S., Cárdenas, M. E. C., & Camarillo, S. D. R. (2024). Identificación de péptidos lineales como prospectos inmunogénicos *in silico* contra *Anaplasma marginale*. *Inventio*, 1-7.

Allred DR, McGuire TC, Palmer GH, Leib SR, Harkins TM, McElwain TF, Barbet AF. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87(8):3220-4.

Amaro Estrada I, et al. (2020), Transmission of *Anaplasma marginale* by unfed *Rhipicephalus microplus* tick larvae under experimental conditions. *Rev. mex. de cienc. pecuarias*. vol.11, n.1 pp.116-131.

Bautista-Garfias, C. R., Castañeda-Ramirez, G. S., Torres-Acosta, J. F. J., Salinas-Estrella, E., Moshin, M., Aguilar-Marcelino, L. (2021). Fly borne diseases in animals. In: Abbas RZ and Khan A, editors. *Veterinary Pathobiology and Public Health*. 114-127.

Cobaxin-Cardenas, M. E., Díaz, H. A., Avelino, P. O., Salinas-Estrella, E., Preciado-de la Torre, J. F., Quiroz-Castañeda, R. E., ... & Rodríguez-Camarillo, S. (2019). Primer abordaje para la propagación de *Anaplasma marginale* (MEX-31-096) en células de garrapata Rm-sus. *Revista del Centro de Investigación de la Universidad la Salle*, 13(51), 67-80.

Artículos

De la Fuente, J., Van Den Bussche, R. A., Garcia-Garcia, J. C., Rodríguez, S. D., García, M. A., Guglielmone, A. A., ... & Kocan, K. M. (2002). Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. *Veterinary microbiology*, 88(3), 275-285.

De La Fuente, J., Passos, L. M., Van Den Bussche, R. A., Ribeiro, M. F., Facury-Filho, E. J., & Kocan, K. M. (2004). Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Veterinary parasitology*, 121(3-4), 307-316.

De la Fuente, J., Ruybal, P., Mtshali, M. S., Naranjo, V., Shuqing, L., Mangold, A. J., ... & Kocan, K. M. (2007). Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Veterinary Microbiology*, 119(2-4), 382-390.

Garcia-Garcia, J. C., de la Fuente, J., Bell-Eunice, G., Blouin, E. F., & Kocan, K. M. (2004). Glycosylation of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and its putative role in adhesion to tick cells. *Infection and immunity*, 72(5), 3022-3030.

Jiménez-Ocampo R, et al. (2012) Genetic diversity of the *msp1a* gene variable region and *msp4* gene of *Anaplasma marginale* strains from Mexico. *Rev Mex Cienc Pecu*; 3:373-387.

Kocan KM et al, (2008) The Natural History of *Anaplasma marginale*, *Veterinary Parasitology*, doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.012

McGarey, D. J., & Allred, D. R. (1994). Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infection and immunity*, 62(10), 4587-4593.

Rodríguez, S. D., Ortiz, M. A. G., Ocampo, R. J., & y Murguía, C. A. V. (2009). Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1092-1101.

Salinas-Estrella, E., Amaro-Estrada, I., Cobaxin-Cárdenas, M. E., Preciado de la Torre, J. F., & Rodríguez, S. D. (2022). Bovine Anaplasmosis: Will there ever be an almighty effective vaccine? *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 946545.



www.smbb.com.mx