Revista de la Sociedad Mexicana de

Biotecnología y Bioingeniería A.C.

Año 2013 Volúmen 17 Número 3
ISSN 0188-4786

Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería

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

MESA DIRECTIVA

Dr. Gerardo Saucedo Castañeda
Presidente

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Vice-Presidente

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Secretaria

Dr. Mauricio Trujillo Roldán
Tesorero

Dr. José Adelfo Escalante Lozada
Subsecretario

Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez
Vocal Profesional

M. en B. Maria Teresa Torres Mancera
Vocal Estudiante

COORDINADOR EDITORIAL

Ing. Rubén Castillo Alamilla

FORMACION EDITORIAL

Ing. Rubén Castillo Alamilla

COMITÉ EDITORIAL

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

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
CINVESTAV

Dr. Fernando Luis García Carreño
CIBNOR

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
UAM-I

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Sara Solís Pereira
Instituto Tecnológico de Mérida

Dra. Elizabeth Langley McCarron
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Víctor Manuel Loyola
Centro de Investigación Científica de Yucatán

DISEÑO GRAFICO E IMAGEN

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

ADSCRIPCIONES Y PUBLICIDAD

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

ISSN 0188-4786, revista electrónica cuatrimestral, publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. e incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICHUNAM). Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título04-1999-082516265000-101. Los Conceptos que aparecen en la revista son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Del. Tlalpan, México, D.F. o a la siguiente dirección electrónica: smbb1982@gmail.com

Índice

Editorial

Peroxidasa de Nabo un Modelo de Estudio de las Enzimas de Plantas 4
Dr. Carlos Regalado González

Instrucciones para autores 7

ARTÍCULOS

Biosurfactantes Microbianos, Producción Potencial con Residuos Agroindustriales de Chiapas
Gustavo Yañez-Ocampo, Arnoldo Wong-Villarreal 12

Biología Sintética: La Próxima Revolución Industrial
Antonio Bensussen y Angélica Meneses-Acosta 29

Avances en la Aplicación de Mediadores Redox Durante la (Bio)Transformación de Contaminantes Recalcitrantes
Luis H. Alvarez, Francisco J. Cervantes, Pablo Gortares 43

Efecto de la Clonación del Gen zwf sobre la Producción de Shikimato en la Cepa de Escherichia coli PB12.SA22
Susy Carmona, Francisco Bolívar, Adelfo Escalante 66

Vacunas de ADN Plasmídico: Una Herramienta Terapéutica Emergente
Gheorghe M. Borja, Octavio T. Ramíreza y Alvaro R. Lara 87

Peroxidasa de Nabo un Modelo de Estudio de las Enzimas de Plantas

El estudio de las enzimas es una tarea muy amplia, que requiere las contribuciones de un grupo multidisciplinario, con el fin de estudiar mecanismos de catálisis, biofísica de macromoléculas, ingeniería de proteínas, bioinformática, simulación *in silico*, biología molecular y actualmente nanotecnología. Esta forma de abordar el estudio de las enzimas nos fue inculcado por el recientemente fallecido (en el mes de septiembre de este año) Dr. John R. Whitaker quien fue miembro correspondiente de la Academia Mexicana de Ciencias, debido a su trayectoria de calidad mundial en el estudio de las enzimas en alimentos. El Dr. Whitaker recibió dos cátedras patrimoniales para estancias en el Grupo de Biotecnología, del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) de la Facultad de Química de la UAQ, además de impartir por 14 años el curso de Proteínas y Enzimas en el DIPA. Su conducta profesional fue una inspiración para sus estudiantes, y colegas entre los cuales fuimos distinguidos con sus enseñanzas y su experiencia, siendo su filosofía "Trabaja lo mejor que puedas y marca la diferencia; sirve a tu prójimo, sé humilde dando crédito cuando sea necesario". Su capacidad de innovación, generosidad y su gran sentido de amistad con todos sus colegas y colaboradores, entre los cuales nos encontramos, fueron siempre su sello distintivo.

Las peroxidasas (E.C. 1.11.1.7) son oxidoreductasas que catalizan la reacción entre peróxido de hidrógeno y varios compuestos reductores y la mayoría contienen Fe(III) protoporfirina IX como grupo prostético. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y se han identificado en plantas microorganismos y animales. En plantas participan en procesos de lignificación y el mecanismo de defensa en tejidos dañados físicamente o infectados. En la industria de alimentos constituye un indicador de escaldado de vegetales debido a su relativamente alta estabilidad térmica. La peroxidasa de rábano picante (*Armoracia rusticana*) es la más abundante comercialmente y se ha utilizado para síntesis orgánica, análisis enzimáticos acoplados, ensayos de quimioluminiscencia y terapia de cáncer. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que las peroxidasas de nabo (*Brassica napus*) pueden tener propiedades similares o mejoradas, ya que hemos aislado peroxidasas neutras, ácidas y básicas de esta fuente que es abundante en México. Por otro lado, hemos caracterizado las propiedades cinéticas, térmicas, termodinámicas y estructurales de dichas isoenzimas

La descontaminación de aguas residuales conteniendo compuestos fenólicos se ha realizado usando una isoforma ácida para la descontaminación de compuestos fenólicos presentes en aguas residuales de la industria petrolera y de pinturas, tales como fenol, 2-clorofenol, 3-clorofenol y 2,4-diclorofenol. Para mejorar la eficiencia de esta enzima se decidió modificarla químicamente utilizando metoxi-polietilén glicol que proporcionó una mayor estabilidad enzimática y una actividad que fue 2.5 veces mayor que su contraparte

nativa, probablemente debido a una mejor accesibilidad del sustrato cerca del sitio activo, que involucra al grupo hemo; además presentó una disminución en la carga neta positiva de la proteína que condujo a una menor repulsión electrostática y por tanto un efecto de estabilización. La peroxidasa modificada también presentó una mejor estabilidad térmica y una buena tolerancia a compuestos orgánicos como dimetilformamida (25%), metanol (40%), y dioxano (20%).

Se decidió utilizar la peroxidasa nativa inmovilizada en esferas de alginato, poniendo en contacto las esferas en un reactor con compuestos fenólicos. Se obtuvo una eficiencia de remoción ≥ 65% durante 15 ciclos. Posteriormente, se decidió inmovilizar en las esferas de alginato la peroxidasa modificada químicamente, en donde se repitieron ciclos de contacto con compuestos fenólicos, siendo capaz la enzima de remover >90% de los fenoles después de 11 ciclos de reacción, mientras que una eficiencia ≥65% se obtuvo luego de 17 ciclos de remoción. La modificación de la enzima permitió un reuso extendido para la transformación de una solución de fenoles de elevada concentración. La reducción eficiente de contaminantes industriales tales como los compuestos fenólicos puede ayudar a evitar una posible acumulación en la cadena alimenticia. Resultados de pruebas toxicológicas indicaron una significativa pérdida de toxicidad después de la polimerización de los compuestos fenólicos de las mezclas sintéticas empleadas en estos estudios.

Los métodos de purificación clásicos de proteínas involucran procesos tediosos y lentos, con bajos rendimientos, además de la difícil tarea de separar las isoenzimas. Métodos moleculares como la clonación pueden ayudar a la búsqueda de peroxidasas que muestren buenas propiedades catalíticas, como la isoenzima ácida de la peroxidasa del nabo. La capacidad de esta enzima para remover concentraciones relativamente altas de compuestos fenólicos tanto en agua sintética como residuos industriales, la hace una buena candidata. Existen pocos estudios sobre la expresión de peroxidasa de nabo recombinante, mientras que cantidades significativas de esta enzima pudieran ser prometedoras en la búsqueda de peroxidas novedosas y más económicas. La expresión de proteínas eucarióticas en *E. coli* no siempre es sencilla debido a que los codones eucariotes ocurren de manera poco frecuente en *E. coli*. Otro detalle relevante consiste en que la peroxidasa de nabo tiene alrededor de 9% de glucosilación y se sabe que la expresión bacteriana no es capaz de glucosilar proteínas recombinantes. No obstante, en un trabajo previo nuestro grupo publicó que aún estando parcialmente desglucosilada (88%) se retuvo 40% de la actividad, sin tenerse efectos en la conformación estructural. Por otro lado, hemos previamente aislado, secuenciado y clonado un cDNA de peroxidasa ácida del nabo. Por tanto, nos propusimos lograr una expresión heteróloga de esta peroxidasa, ligando el gen en el vector pET 28(+) el cual se usó para transformar *E. coli* Rosetta 2. La peroxidasa recombinante se sobre-expresó exitosamente siendo el primer estudio reportado en nuestro país y uno de los poco a nivel internacional, utilizando tanto el análogo de lactosa isopropilo-β-D-tiogalactopiranósido, así como la propia lactosa con el fin de disminuir los costos de la sobre-expresión. La enzima recombinante se purificó en una sola etapa a 98% de pureza con un rendimiento de 36 mg/L

de cultivo. Esto es solo el principio para las posibles aplicaciones biotecnológicas de la enzima recombinante, que pueden desarrollarse en el área de inmunodetección, inmunohistoquímica, bio- y nano sensores.

Dr. Carlos Regalado González
DIPA, PROPAC, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, C.U., Cerro de las Campanas s/n Querétaro, 76010, Qro. Email: regcarlos@gmail.com

Guía de Autores

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

Los idiomas de la revista son el Español y el Inglés.

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

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

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

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

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

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

1. ¿Qué es y para qué sirve la Biotecnología?. Es decir: descripciones que ilustren y divulguen los distintos campos de la biotecnología, sus alcances y limitaciones, su historia y sus perspectivas.

2. Las fronteras de la biotecnología: revisiones de nuevos campos o nuevas aplicaciones de la biotecnología. Por ejemplo: las perspectivas del uso de los genomas para el desarrollo de nuevas drogas o para el tratamiento de enfermedades metabólicas. Las perspectivas de la genómica (estudio sistemático de los genes y sus aplicaciones), la proteómica (predicción de la expresión de los genes en proteínas funcionales) y la fenómica (predicción de fenotipos o conductas de los organismos, en base a sus genes y a sus proteínas). El uso de la ingeniería genética para hacer ingeniería metabólica. Los nuevos tipos de reactores biológicos y los fenómenos de transporte implicados. Los nuevos esquemas de reacción, separación y control en procesos biotecnológicos.

3. Aplicaciones de la Biotecnología para resolver problemas o atender necesidades de la sociedad, con especial atención a sus aplicaciones ya vigentes en México. Esta sección será dedicada a una empresa o institución (pública o privada) que desee difundir los logros obtenidos en algún campo de la biotecnología. Por ejemplo: empresas productoras de antibióticos o productos biológicos, empresas de ingeniería ambiental que usen procesos biotecnológicos, empresas agropecuarias, forestales o de acuacultura que usen tecnologías biológicas avanzadas, o empresas de transformación de alimentos que utilicen enzimas, cultivos de microorganismos, etc. Esta lista es indicativa pero no exhaustiva.

4. Problemas de bioseguridad, bioética y biodiversidad relacionados con las aplicaciones de la biotecnología a la sociedad. Por ejemplo: análisis y comentarios sobre los debates acerca del uso de semillas transgénicas, los problemas de conservación y explotación de la biodiversidad mediante la biotecnología, los riesgos del uso de organismos transgénicos en diversos campos de la industria, los problemas de bioseguridad del uso de antibióticos y otros productos biotecnológicos.

5. La educación, la cultura y la difusión tecnológica en relación con la biotecnología. Por ejemplo: comentarios de planes y programas, de estilos y necesidades de la enseñanza, del enfoque interdisciplinario, en carreras o planes de estudio directamente ligados con la biotecnología. También necesidades y modalidades sobre programas de extensión educativa para la industria, para el público consumidor o para grupos selectos de personas interesadas en la biotecnología (políticos, funcionarios de empresas, líderes de opinión). El uso de la informática en la difusión de la biotecnología, y en general, el análisis de necesidades, métodos y alternativas para difundir los conocimientos de la biotecnología.

6. Oportunidades y propuestas para mejorar la cooperación y el desarrollo biotecnológicos. Por ejemplo: Análisis de las oportunidades vigentes de intercambio académico o comercial en biotecnología. Propuestas de nuevas formas de cooperación entre los sectores de investigación y la industria biotecnológica. Análisis y propuestas del uso óptimo de recursos humanos, financieros o materiales para mejorar la cooperación o el desarrollo de la biotecnología. En esta sección se dará espacio a los análisis, críticas o propuestas de los aspectos legales y fiscales que afecten e incluso puedan mejorar el desarrollo de la biotecnología en México. Tales como: la propiedad industrial, el régimen fiscal de las empresas, el costo del desarrollo biotecnológico y los subsidios o estímulos económicos para el desarrollo de la biotecnología.

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

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

2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño **12**. Los nombres de los

participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como el e-mail del autor corresponsal.

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

4. Se incluirán entre 3 a 6 **Palabras clave:** que permitan clasificar el artículo en una base de datos.
Estas palabras deberán de incluirse en Español y en Inglés (**Key words:**).

5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste 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. La impresión de las figuras e imágenes se hará en blanco y negro, por lo que se recomienda que muestren un buen contraste, en especial las figuras con varias líneas. Según el orden de aparición en el texto, las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto pero se anexarán en hojas separadas después de las **Referencias**.

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

Para revistas:

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

Para libros y capítulos de libros:

(Libro)

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

(Capítulo de libro)

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

Para patentes:

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

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

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & 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.

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

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

Revistas electrónicas:

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

Para tesis de pre y posgrado:

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

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

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

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

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

Biosurfactantes Microbianos, Producción Potencial con Residuos Agroindustriales de Chiapas

Gustavo Yañez-Ocampo[1], Arnoldo Wong-Villarreal[2]

[1]*Programa Académico de Ingeniería en Tecnología Ambiental. Universidad Politécnica de Chiapas. Calle Eduardo J. Selvas S/N. Col. Magisterial C.P. 29010. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Tel. 01961 61 204 84 ext.120.*

[2]*División Agroalimentaria; Universidad Tecnológica de la Selva, Ocosingo, Chiapas, México.*

**Correspondencia: gyanez@upchiapas.edu.mx*

RESUMEN

Los biosurfactantes producidos por hongos y bacterias, son moléculas anfifílicas que tienen propiedades tensoactivas, emulsificantes y dispersantes. Estos compuestos están clasificados por su alto y bajo peso molecular (glucolípidos de ramnosa y trehalosa). Son capaces de reducir la tensión superficial entre la fase acuosa y oleaginosa. En la biotecnología ambiental, los biosurfactantes están ganando interés, para aplicarlos en procesos de biorremediación de ambientes contaminados con compuestos orgánicos persistentes, debido a que incrementan la biodisponibilidad y biodegradabilidad. Desde el punto de vista biotecnológico, para la producción de biosurfactantes es importante seleccionar una fuente de carbono ideal, por ejemplo materia prima accesible y barata como los residuos agroindustriales. En el Estado de Chiapas, México, la actividad agrícola genera anualmente entre 28 y 140 mil toneladas de residuos de plátano, mango, café entre otros. Además en Chiapas, la producción de biodiesel desecha alrededor de mil toneladas al año de glicerina cruda como resultado del proceso. Los residuos agroindustriales que no son aprovechados en Chiapas, representan materia prima como fuente de carbono para la síntesis de biosurfactantes por métodos biotecnológicos.

Palabras clave: ramnolípido, biosurfactante, agroindustria

ABSTRACT

The biosurfactants produced by fungi and bacteria, are amphiphilic molecules with tensoactive, emulsifying and dispersing properties. These compounds are classified by their high and low molecular weight (rhamnose and trehalose glucolipids). They are capable to reduce the surface tension between the aqueous and oleaginoseous phase. In environmental biotechnology biosurfactants are gaining interest, to be applied in bioremediation processes of polluted

environments with persistent organic compounds, because they enhance bioavailability and biodegradability. From biotechnological point of view, to produce biosurfactants is important to select an ideal carbon source, for example raw material accessible and cheap as agroindustrial wastes. In Chiapas, Mexico, agricultural activity generates annually between 28 and 140 thousand tons of banana, mango, coffee and other wastes. Besides biodiesel production in Chiapas, throw away about one thousand tons of crude glycerol per year as a result of the process. Agroindustrial wastes not used in Chiapas, represent raw material as carbon source to biosurfactants synthesis by biotechnological methods.

Key words: rhamnolipid, biosurfactant, agroindustry

INTRODUCCIÓN

Los biosurfactantes (BS) son compuestos producidos principalmente por hongos y bacterias. Estas moléculas tienen propiedades emulsificantes y dispersantes, disminuyen la tensión superficial del agua de 72 a 25 mN/m aproximadamente. Los microorganismos sintetizan BS cuando la fuente de carbono es parcialmente soluble o insoluble en agua, de esta manera están obligados a sintetizar moléculas con propiedades tensoactivas que favorezcan la biodegradación de los sustratos insolubles (Supaphol *et al.,* 2011).

Por ésta razón, a partir de sitios contaminados con residuos de baja solubilidad, se han aislado microorganismos productores de BS, los cuales han sido aplicados en procesos de biorremediación de sitios contaminados con metales pesados, plaguicidas organofosforados, hidrocarburos totales del petróleo y aceites sintéticos, ya que los BS incrementan su biodisponibilidad y biodegradabilidad (Banat *et al.,* 2000; Ortíz-Hernández *et al.,* 2001; Yañez-Ocampo *et al.,* 2009; Yañez-Ocampo *et al.,* 2011). Adicionalmente los BS tienen una amplia variedad de aplicaciones en procesos alimenticios, industriales, cosméticos entre otros (Singh *et al.,* 2007).

La ruta biotecnológica para la producción de BS incluye desde la exploración, aislamiento, adaptación y selección de cepas de microorganismos potencialmente productores, la selección de la fuente de carbono ideal para el medio de cultivo, hasta las condiciones de cultivo, separación, purificación e identificación del compuesto con actividad tensoactiva. Su producción a gran escala aún está limitada, en parte por el costo de las fuentes de carbono que se usan como materia prima, por lo que actualmente se están estudiando residuos orgánicos baratos a partir de los cuales se puedan sintetizar BS con propiedades emulsificantes (Makkar *et al*., 2011).

En este sentido, en el Estado de Chiapas la actividad ganadera y agrícola, genera anualmente entre 28 y 140 mil toneladas residuos agroindustriales de plaguicidas, excretas de ganado, residuos de las

cosechas y procesamiento del maíz, café, cacao, mango, plátano, palma de aceite; paralelamente también se genera cerca de mil ton/año de glicerina cruda proveniente de la producción de biodiesel obtenido por transesterificación del aceite vegetal usado (SAGARPA, 2007). Es por ello que estos residuos agroindustriales son susceptibles de ser evaluados como materia prima para su aprovechamiento en la síntesis microbiana de BS. Por lo antes descrito, el presente artículo aborda el estado del arte sobre el origen y composición de biosurfactantes microbianos, se describe la ruta biotecnológica probable para su producción y se identifica la posibilidad de aprovechar los residuos provenientes de la agroindustria chiapaneca.

ORIGEN DE LOS BIOSURFACTANTES MICROBIANOS

Con la contaminación al ambiente por petróleo, a partir de la década de 1970 se comenzaron a sintetizar surfactantes, es decir, compuestos sintéticos con actividad tensoactiva, a fin de remover hidrocarburos y recuperar los ambientes contaminados. Los surfactantes sintéticos (SS) por su composición química pueden ser aniónicos, catiónicos y no iónicos y poseen propiedades emulsificantes, dispersantes, entre otras (Cort *et al.*, 2002). Los SS ayudan a remover los contaminantes del medio, ya que permiten la desorción de contaminantes hidrofóbicos en suelo, agua y otros ambientes. Sin embargo se ha reportado que los SS son tóxicos para algunos microorganismos indicadores, su efecto también se refleja sobre la baja eficiencia en la biodegradación, hecho que los hace poco recomendables como aditivos para la biorremediación de sitios contaminados (Ivshina *et al.*, 1998; Karanth *et al.*, 1999). Debido a la ecotoxicidad que tienen los SS al ambiente, la tendencia se dirige hacia la búsqueda de moléculas tensoactivas, productos biodegradables y tecnologías que sustituyan el uso de SS a fin de disminuir el impacto que estos tienen sobre el ambiente.

A partir de muestras de sedimentos, suelos y agua (salada o dulce) de sitios contaminados con compuestos hidrofóbicos, se han aislado hongos y bacterias capaces sintetizar BS y con ello favorecer la biodegradación. En la Tabla 1 se reportan los principales microorganismos productores de BS (Christofi & Ivshina 2002; Hudak & Cassidy, 2004).

Tabla 1. Microorganismos productores de biosurfactantes

Microorganismo	Tipo de biosurfactante
Azotobacter chroococcum	Lipopeptido
Bacillus subtilis HOB2	Lipopeptido
Bacillus subtilis strain ZW-3	Lipopeptido
Bacillus velezensis H3	Lipopeptido
Burkholderia plantari DSM 9509	Ramnolípido
Calyptogena soyoae	Manosileritritol lípido
Candida bombicola	Soforolípidos
Micrococcus luteus BN56	Trehalosa tetraester
Nocardiopsis alba MSA10	Lipopeptido
Nocardiopsis lucentensis MSA04	Glucolípido
Pseudomonas aeruginosa BS20	Ramnolípido
P. alcaligenes	Ramnolípido
P. fluorescens BD5	Lipopeptido
Plibanensis M9-3	Lipopeptido
Pseudoxanthomonas sp. PNK-04	Ramnolípido
Pseudozyma graminicola CBS 10092	Manosileritritol lípido
Pseudozyma hubeiensis	Glucolípido
Pseudozyma parantarctica	Manosileritritol lípido
Pseudozyma siamensis CBS 9960	Manosileritritol lípido
Rhodococcus erythropolis 3C-9	Glucolípido y trehalípido
Rhodococcus sp. TW53	Lipopeptido

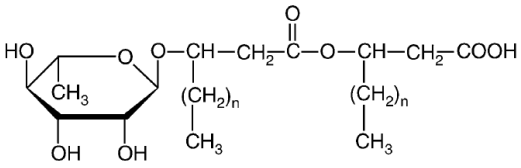
Fuente: Modificado de Makkar *et al*. 2011.

Los BS microbianos mejor estudiados son los glucolípidos (ramnolípidos, trehalolípidos y soforolípidos). Particularmente bacterias del género *Pseudomonas* sp. producen mono y diramnolípidos, la ruta de biosíntesis involucra la participación de ramnosiltransferasas RhlB y RhlC. La producción de ramnolípidos en *P. aeruginosa* está fuertemente controlada por regulación genética (transcripcional y postranscripcional) en los operones *rmlBDAC* y *rhlAB* que responde a una amplia variedad de condiciones ambientales y señales fisiológicas denominadas *quorum sensing*. Adicionalmente se conoce que un exceso en la fuente de carbono y un estrés en la fuente de nitrógeno, favorecen la producción de ramnolípidos (Lin *et al.,* 1998; Soberón-Chávez *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2013).

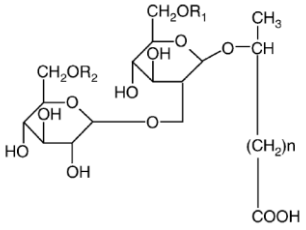
Los biosurfactantes producidos por *Rhodococcus* sp., entre otras especies, no han sido explorados y caracterizados detalladamente. Se ha reportado que levaduras del género *Candida* sp. sintetizan BS lípidos de manosileritritol (Kim *et al.*, 1999). Así mismo, especies del género *Bacillus* sp. *v. gr. B. subtilis* y *B. licheniformis* son productores de biosurfactantes bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas facultativas, adicionalmente se trata de cepas que no son patógenas lo cual es importante considerar para usos en la industria farmacéutica y alimenticia (Lang & Philp, 1998; Al-bahry *et al.*, 2012).

COMPOSICIÓN Y FUNCIÓN DE LOS BIOSURFACTANTES

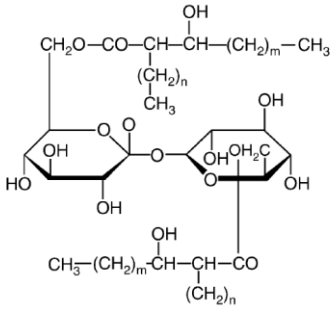
Los biosurfactantes microbianos (BS) son moléculas anfipáticas compuestas por dos regiones, la región hidrofílica o polar compuesta de un carbohidrato (ramnosa, trehalosa, manosa) o un aminoácido y la región hidrofóbica o no polar constituida de una cadena hidrocarbonada de longitud variable (ácidos grasos saturados e insaturados); pueden ser aniónicos, catiónicos, no iónicos y switeriónicos (Figura 1) (Desai & Banat, 1997). Los BS están agrupados en aquellos que son de alto peso molecular cuya composición bioquímica se basa en lipopolisacáridos y lipoproteínas y los que son de bajo peso molecular normalmente su composición son ácidos grasos, glucolípidos y lipopéptidos (Banat *et al.,* 2000; Banat *et al.,* 2010).



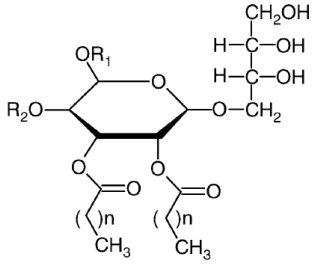
Monoramnolípido



Soforolípido ácido



Dimicolato de trehalosa



Lípido de manosileritritol

Fig. 1. Estructuras químicas generales de los glucolípidos microbianos

Así como los SS, los BS tienen propiedades emulsificantes, dispersantes, impermeabilizantes, suavizantes, lubricantes y humectantes. Estas moléculas tienen la capacidad de reducir la tensión superficial e interfacial entre sólidos, líquidos y gases. (Konishi *et al.*, 2007; Jiménez *et al.*, 2010). Los microorganismos producen BS con dos finalidades la primera es romper la tensión superficial (TS) e interfacial entre fase líquido/líquido, gas/líquido, sólido/líquido, por ejemplo el agua destilada tiene una tensión superficial de 72 mN/m, los BS producidos por *P. aeruginosa* y *R. erythropolis* disminuyen la TS en 25 y 36 mN/m respectivamente. La segunda finalidad es formar micelas, para ello el parámetro que permite estudiar la actividad tensoactiva es la Concentración Micelar Crítica (CMC) este valor es calculado para conocer la concentración de BS a la que se logra la formación de micelas, los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* tienen una CMC de 0.1 a 10 mg/l (Singh *et al.*, 2007; Rahman & Gakpe, 2008).

Ambas funciones permiten incrementar la transferencia de masa ya que hacen que aquellas fuentes de carbono de baja solubilidad estén más disponibles para su biodegradación e incorporarlos a rutas metabólicas convergentes para la generación de energía y síntesis de biomasa. Los BS favorecen la biodisponibilidad de los contaminantes al establecer un equilibrio de desorción-solubilización, desplazan preferentemente el equilibrio hacia la fase acuosa y permiten que se lleven a cabo los diferentes procesos de transporte (difusivo y convectivo) y biodegradación del contaminante (Rosenberg & Ron, 1999; Kitamoto *et al*., 2002).

VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Los biosurfactantes adecuados para ser aplicados en procesos de biorremediación, deben ser de baja ecotoxicidad, producidos por microorganismos inocuos, tener una alta actividad tensoactiva bajo condiciones ambientales extremas de pH, temperatura, salinidad y que además en el proceso de su producción la cepa del microorganismo tenga una alta eficiencia.

Con respecto a los surfactantes sintéticos, los biosurfactantes tienen ventajas y desventajas que se muestran en la tabla 2 (Singh *et al.*, 2007; Rahman & Gakpe, 2008). Los biosurfactantes son compuestos extracelulares, biodegradables, tienen baja toxicidad, los glucolípidos de *Rhodococcus* sp. 413, son 50% menos tóxicos que el Tween80. Los biosurfactantes pueden ser producidos a partir de materias primas baratas (residuos y subproductos industriales). La utilización de sustratos baratos es de particular importancia para reducir los costos de producción de BS para aplicaciones farmacéuticas, cosméticas y alimenticias.

Tabla 2. Comparación de las ventajas y desventajas de los biosurfactantes (Rahman y Gakpe 2008).

VENTAJAS	DESVENTAJAS
✓ Son extracelulares y biodegradables	× Regulación de la síntesis de biosurfactantes poco comprendida
✓ Baja ecotoxicidad	× Producción costosa a gran escala
✓ Amplio espectro de actividad tensoactiva a condiciones de pH, salinidad y temperatura extremos	× Dificultad en la obtención de biosurfactantes puros
✓ Propiedades emulsificantes, dispersantes similares a los SS	
✓ Ambientalmente aceptables en procesos de biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos	
✓ Incrementa la eficiencia de remoción de petróleo	

RUTA BIOTECNOLÓGICA DE PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES MICROBIANOS A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

A partir del aislamiento de cepas de hongos o bacterias preferentemente de ambientes contaminados, se realiza la selección de las cepas microbianas potencialmente productoras de BS mediante el cultivo en agar con medios selectivos y diferenciales, particularmente se busca la actividad hemolítica, los halos del crecimiento de las colonias microbianas sobre el agar, proporcionan información sobre posibles cepas candidatas productoras de biosurfactantes.

Posteriormente las cepas seleccionadas son adaptadas a crecer en condiciones de laboratorio en medio líquido, para ello es indispensable evaluar fuentes de carbono adecuadas. Se conoce que los biosurfactantes son sintetizados a partir de parafinas, sin embargo recientemente se emplean residuos provenientes de la agroindustria (plaguicidas y residuos de cosechas agrícolas) ya que son materia prima barata, accesible y paralelamente permite abatir un problema de contaminación, ver tabla 3 (Cassidy & Hudak, 2001; Kitamoto *et al*., 2002; Abasi *et al.*, 2011; Abasi *et al.*, 2013). Las materias primas como la glicerina residual y residuos de aceites vegetales, podrían ser viables para la producción de biosurfactantes, en función de las altas concentraciones que se obtienen. En condiciones de laboratorio, se

ha reportado que la limitación en nitrógeno estimula la producción de BS, por ésta razón se debe considerar al momento de la elaboración del medio de cultivo (Ron & Rosenberg, 2001). Abbasi *et al.* (2011), demostraron la producción de biosurfactantes a partir de residuos de frutas, aceites vegetales y residuos de la industria de alimentos. En su estudio la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* MA01 logró la producción de biosurfactantes (glucolípidos) en12 g/l y un índice de emulsificación del 50%.

Tabla 3. Fuentes de carbono y concentración final de biosurfactantes microbianos

Biosurfactante	Microorganismo	Concentración final (g l^{-1})	Fuente de Carbono
Manosileritritol lípido			
MEL-A,-B and –C	*Candida antarcitica* T-34	140	*n*-Octadecano
		47	Aceite de soya
MEL-SY16	*C. Antarctica* KCTC 7804	41	Glycerol, ácido oleico
Ramnolípido			
RL-1, -2, -3	*Pseudomonas* sp. DSM 2874	15	*n*-Tetrdecano
RL-1 y-2	*P. aeruginosa* DSM 7107	112	Aceite de soya
RL-1 y-2	*P. aeruginosa* UI 29791	46	Aceite de maíz
RL-A y-B	*P. aeruginosa* BOP 101	14	*n*-Parafina
Trehalosa lípido			
Trehalosa-tetraester	*R. erythropolis* DSM 43215	32	*n*-Decano
STL-1 y-2	*R. erythropolis* SD-74	40	*n*-Hexadecano
Celobiosa lípido			
CL-A, -B y –C	*Ustilago maydis* ATCC 14826	16	Aceite de coco
Soforosa lípido			
SL mezcla	*C. bombicola* ATCC 22214	422	Suero de leche
SL mezcla	*C. bombicola* CBS 6009	317	Glucosa esteres
SL mezcla (SL-1: 73%)	*C. bombicola* ATCC 22214	160	Aceite de canola
SL (lactona)	*C. apicola* IMET 43747	90	Aceite de girasol

Fuente: Modificado de Kitamoto *et al*. 2002.

Adicionalmente deben establecerse las condiciones de cultivo óptimas de agitación, pH, temperatura y tiempo de incubación. En el caso del cultivo a escala de laboratorio de

P. aeruginosa y *Klebsiella* sp., se realizan bajo condiciones aerobias y mesófilas en cultivos en lote con cinéticas de alrededor de 70 horas (Lee *et al.*, 2008; Arutchelvi *et al.*, 2011).

Para determinar la presencia de biosurfactantes totales (glucolípidos) en el medio de cultivo es recomendable llevar a cabo ensayos de detección de azúcares, los métodos de antrona, Fehling y DNS son los más comunes, para cuantificar ramnosa y trehalosa, elaborando previamente la curva patrón respectiva.

Posterior a su cultivo, la siguiente etapa es la recuperación y purificación, en la tabla 4 se reportan los métodos más usados dependiendo de los tipos de BS. El método comúnmente empleado para la recuperación es la centrifugación, en virtud de que los biosurfactantes de origen microbiano son compuestos son extracelulares. El sobrenadante colectado, puede ser concentrado mediante extracción con solventes orgánicos, es indispensable considerar mezclas de solventes con diferentes polaridades, *v. gr.* cloroformo: metanol (2:1 v/v), ya que se trata de muestras con extractos crudos de biosurfactantes totales, también es posible implementar la precipitación ácida (pH 3) con ácido clorhídrico o bien precipitación por sulfato de amonio. La cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés) se realiza para la detección de glucolípidos y al mismo tiempo tener información parcial sobre su composición bioquímica, para ello se emplean placas de silica gel y un sistema de solventes como cloroformo:metanol:ácido acético (Kim *et al.*, 1999; Kuyukina *et al.,* 2001).

Tabla 4. Métodos de separación para la extracción y purificación parcial de biosurfactantes (Kretschmer *et al.* 1982, Kuyukina *et al.* 2001, Singh *et al.* 2007).

METODO DE SEPARACIÓN	TIPO DE BIOSURFACTANTE
Adsorción	Ramnolípidos, lipopéptido, glucolípidos
Centrifugación	Glucolípidos
Cristalización	Celobiolípidos, glucolípidos
Diafiltración y precipitación	Glucolípidos
Extracción con solvente	Trehalolípidos, soforolípidos
Precipitación con acetona	Bioemulsionantes
Precipitación con ácido	Surfactina
Precipitación con sulfato de amonio	Emulsan, biodispersan
Ultrafiltración	Glucolípidos

A fin de seleccionar BS con mejores características tensoactivas, a los extractos previamente concentrados, se les hace la prueba de índice de emulsificación la cual consiste brevemente en mezclar vigorosamente varias dosis de BS con diferentes fases hidrofobicas (aceites minerales, sintéticos, vegetales), se mide la altura de la emulsión con respecto a la altura total del liquido y se reporta el porcentaje de emulsión 24 horas después. Adicionalmente se hace la prueba de tensión superficial la cual es reportada en mili Newton por metro (mN/m) y es cuantificada por el método del anillo de Nüoy con ayuda de un tensiómetro previamente calibrado (Smyth *et al.*, 2010). Cabe mencionar que ambas pruebas deben estar validadas por un análisis estadístico.

Para realizar la caracterización y análisis químico estructural, las muestras de los BS seleccionados son estudiadas por espectro de infrarrojo y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Deziel *et al.*, 1999; Smyth *et al.*, 2010; Thavasi *et al.*, 2011).

ESTRATEGIAS PARA DISMINUIR COSTOS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES

Las principales razones por las que está limitada la producción de BS microbianos a nivel industrial, son el uso de sustratos costosos, así como los altos costos de los procesos de separación y purificación. Las estrategias que se pueden abordar para lograr abatir estos costos según Singh *et al.* (2007) y Pacwa-Płociniczak *et al.* (2011) son:

- La selección de sustratos alternativos baratos (*v. gr.* residuos agroindustriales) adecuados para su uso como fuente de carbono para la síntesis de BS
- Diseño de un bioproceso eficiente, mediante la optimización de las condiciones de cultivo en escala de laboratorio y piloto.
- Diseño experimental para validación de resultados con pruebas estadísticas.
- La disminución de los costos por los procesos de separación del BS, dependerá del número de procedimientos que se requieran para extraer el producto, entre los que destacan la extracción con solventes económicos y de bajo impacto ambiental, precipitación ácida, precipitación con sulfato de amonio, cristalización, centrifugación, adsorción y fraccionamiento con espuma (Tabla 4) (Kuyukina *et al.*, 2001).
- Incrementar la producción y rendimiento a través del desarrollo de cepas mutantes o recombinantes sobre productoras de BS.

USO POTENCIAL DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES EN CHIAPAS

En el Estado de Chiapas, existe una fuerte actividad agroindustrial principalmente

en los municipios de Acala, Cintalapa, Comitán, Chicomuselo, Chilón, Jiquipilas, La Concordia, Ocosingo, Socoltenango, Tonalá, Villacorzo, Villaflores, Villa de las Rosas entre otros. En la entidad se producen diversos cultivos cíclicos como maíz, frijol, sorgo, soya, cacahuate, ajonjolí; y cultivos perennes como café, cacao, caña de azúcar, mango, plátano y palma de aceite. A estos productos se les dedica más del 95% de la superficie cultivada. Como consecuencia de la intensa actividad agrícola, en el Estado de Chiapas se generan anualmente entre 28,000 - 140,160 toneladas de residuos agroindustriales de bagazo de la cosecha agrícola (SAGARPA, 2007; Valdéz-Vázquez *et al.,* 2010).

Paralelamente en los municipios de Tuxtla Gutiérrez y Tapachula se encuentran actualmente instaladas dos estaciones de producción de biodiesel, cuya producción se basa en la transesterificación del aceite vegetal. Al final del proceso se obtiene un 10% de glicerina cruda cuya composición es 50 a 60 % de glicerol, 12-16 % álcalis en forma de jabón e hidróxidos, 15-18 % de éster metílico, 8-12 % de metanol, 2-3 % de agua. En consecuencia, el crecimiento industrial del biodiesel ha provocado un excedente de glicerina cruda además de la generación de aguas residuales del mismo proceso (SENER, 2006).

En Chiapas los residuos agroindustriales y la glicerina residual han comenzado a ser aprovechados para la producción de metano por digestión anaerobia ya que se ha reportado que este tratamiento representa una alternativa para la generación de energía renovable a partir de la reutilización de estos residuos orgánicos (Mata-Álvarez *et al.,* 2000; Álvarez-Maciel, 2009; Palatsi *et al.*, 2011). La eficiencia de producción de metano está influenciada, entre otros aspectos, por la solubilidad de los sustratos empleados, ésta eficiencia podría verse incrementada con la adición de biosurfactantes que favorezcan la biodisponibilidad. (Siles-Lopez *et al*., 2009; García *et al.*, 2011; Aguilar, 2013).

Los residuos agroindustriales citados anteriormente generados en la entidad chiapaneca son materia prima barata, abundantes todo el año y pueden ser aprovechados como fuente de carbono para el cultivo de cepas microbianas productoras de compuestos con actividad tensoactiva (García-Peña *et al.*, 2011; Tenca *et al.*, 2011; Aguilar, 2013). Se ha comprobado que mediante el uso de residuos agroindustriales del procesado de aceite de palma, canola, soya, glicerol, suero de leche se puede incrementar hasta 10 veces la producción de BS respecto a la glucosa (Makkar *et al.*, 2011).

APLICACIONES POTENCIALES DE LOS BIOSURFACTANTES

Los biosurfactantes de origen microbiano por sus propiedades emulsificantes y tensoactivas tienen una amplia gama de aplicaciones en sectores industriales diversos como se puede observar en la tabla 5. Desde la industria petroquímica en el proceso de

extracción en pozos, aplicaciones mineras, ambientales en procesos de biorremediación de suelos, hasta aplicaciones agrícolas, en la industria alimenticia como espesantes, la industria farmacéutica y cosmética como agentes antimicrobianos, espesantes y espumantes (Müller et al. 2012).

Tabla 5. Aplicaciones industriales potenciales de los biosurfactantes.

INDUSTRIA	APLICACIÓN Y FUNCIÓN DEL BIOSURFACTANTE
Petrolera	Recuperación mejorada del petróleo. Mejora el drenaje de aceite en pozo; estimula la liberación de petróleo atrapado; humectación de superficies sólidas; reducción de la viscosidad del aceite; disminución de la tensión interfacial.
Minería	Agentes secuestrantes, espumantes y flotantes de metales
Ambiental	Biorremediación. Emulsificación de hidrocarburos; disminución de la tensión interfacial; agente dispersante y espumoso; proceso de lavado de suelo. Tratamiento de lodos de aguas residuales en residuos aceitosos
Alimenticia	Emulsionante, solubilizante, desemulsionante. Suspensión, agente humectante espumoso; espesante, agente lubricante. Ingrediente funcional agente protector que interactúa con lípidos, proteínas y carbohidratos.
Farmacéutica	Antibacteriales. Anti fúngicos; agentes antivirales; agentes adhesivos; moléculas inmunomoduladoras; vacunas
Agrícola	Biocontrol Mecanismos de biocontrol de parásitos, plagas
Bioprocesamiento	Elaboración secundaria. Biocatalisis en sistemas acuosos de dos fases y microemulsiones, biotransformaciones, recuperación de productos intracelulares; mayor producción de enzimas extracelulares y productos de fermentación
Cosmética	Productos de salud y belleza. Emulsionantes, agentes espumosos, solubilizantes, agentes humectantes, productos de limpieza, agente antimicrobiano.

CONCLUSIONES

Los biosurfactantes de origen microbiano, por su actividad tensoactiva, emulsificante y dispersante, son considerados como productos biotecnológicos alternativos para la sustitución de surfactantes sintéticos. El estado de Chiapas, tiene una posición privilegiada en biodiversidad, por esta razón es importante explorar cepas de microorganismos potencialmente productoras de biosurfactantes y el papel que estos juegan en ambientes conservados. Paralelamente los residuos agroindustriales de frutas, suero de leche, aceites vegetales, glicerol crudo (subproducto del biodiesel) generados en la entidad chiapaneca,

representan un nicho de oportunidad para su aprovechamiento como materias primas baratas y accesibles, en la producción de BS a través de métodos biotecnológicos.

REFERENCIAS

Aguilar F (2013) Evaluación del potencial metanogénico de la co-digestión anaerobia con estiércol porcino, de mango ataulfo, plátano macho y glicerina cruda, en reactores tipo batch, en condiciones mesófilas. Tesis de Maestro en Energías Renovables. Universidad Politécnica de Chiapas. Chiapas México. pp. 1-67.

Abbasi H, Hamedi M, Lotfabad TB, Zahiri HS, Sharafi H, Masoomi F, Moosavi-Movahedi A, Ortiz A, Amanlou M & Noghabi K (2011) Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. *J. Biosci. Bioeng.* doi:10.1016/j.jbiosc.2011.10.002

Abbasi H, Noghabib KA, Hamedia MM, Zahiri HS, Moosavi-Movahedi AA, Amanlou M, Teruel JA & Ortiz A (2013) Physicochemical characterization of a monorhamnolipid secreted by *Pseudomonas aeruginosa* MA01 in aqueous media. An experimental and molecular dynamics study. *Coll. Surf. B: Biointerf.* 101:256– 265

Al-Bahry SN, Al-Wahaibi YM, Elshafie AE, Al-Bemani AS, Joshi SJ, Al-Makhmari HS & Al-Sulaimani HS (2012) Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. *Int. Biodeter. & Biodegrad.* doi:10.1016/j.ibiod.2012.01.006

Alvarez-Maciel C (2009) Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Econ. Inf.* 359: 63-89.

Arutchelvi J, Joseph Ch & Doble M (2011) Process optimization for the production of rhamnolipid and formation of biofilm by *Pseudomonas aeruginosa* CPCL on polypropylene. *Biochem. Eng. J.* 56:37– 45.

Banat I, Makkar R & Cameotra S (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 495-508.

Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth T & Marchant R (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:427–444.

Cassidy D & Hudak A (2001) Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically

operated bioslurry reactor. *J. Haz. Mat.* B84: 253–264.

Christofi N & Ivshina IB (2002) Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J. Appl. Microbiol.* 93: 915–929.

Cort T, Song M & Bielefeldt A (2002) Nonionic surfactant effects on pentachlorophenol biodegradation. *W. Res*. 36: 1253–1261.

Desai J & Banat I (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. *Mol. Biol. Rev.* 61(1): 47–64.

Deziel E, Lepine F, Dennie D, Boismenu D, Mamer O & Villemur R (1999) Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim. Biophys. Act.* 1440: 244-252.

Garcia-Peña EI, Parameswaran P, Kang DW, Canul-Chan M & Krajmalnik-Brown R (2011) Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit residues: Process and microbial ecology. *Bioresour. Technol.* 102: 9447–9455.

Garcia SL, Jangid K, Whitman WB & Das KC (2011) Transition of microbial communities during the adaption to anaerobic digestion of carrot waste. *Biores. Technol.* 102: 7249–7256.

Hudak A & Cassidy D (2004) Stimulating In-Soil Rhamnolipid Production in a Bioslurry Reactor by Limiting Nitrogen. *Biotechnol. Bioeng.* 88: 7.

Ivshina I, Kuyukina M, Philp J & Christo N (1998) Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 711-717.

Jiménez D, Medina S & Gracida J (2010) Propiedades, Aplicaciones Y Producción De Biotensoactivos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 26(1):65-84.

Karanth N, Deo P & Veenanadig N (1999) Microbial production of biosurfactants and their importance. *Curr. Sc.* 77:116-126.

Kim H, Yoon B, Choung D, Oh H, Katsuragi T &Tani Y (1999) Characterization of a biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY16. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 713-721.

Kitamoto D, Isoda H & Nakahara T (2002) Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers. *J. Biosc. Bioeng.* 94(3): 187-201.

Konishi M, Imura T, Fukuoka T, Morita T & Kitamoto D (2007) A yeast glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, shows high binding affinity towards lectins on a

self-assembled monolayer system. *Biotechnol. Lett*. 29: 473–480.

Kretschmer A, Bock H & Wagner F (1982) Chemical and Physical Characterization of Interfacial-Active Lipids from *Rhodococcus erythropolis* Grown on n-Alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(4):864-870.

Kuyukina M, Ivshina I, Philp J, Christofi N, Dunbar S & Ritchkova M (2001) Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *J. Microbiol. Met.* 46:149–156.

Lang S &Philp J (1998) Surface-active lipids in rhodococci. A. v. Leeuw.74: 59–70.

Lee S, Lee S, Kim S, Park I, Lee Y, Chung S, Choi Y (2008) Characterization of new biosurfactant produced by Klebsiella sp.Y6-1 isolated from waste soybean oil. Biores. Technol. 99: 2288–2292.

Lin SC, Chen Y & Lin Y (1998) General approach for the development of high-performance liquid chromatography methods for biosurfactant analysis and purification. J. Chromatogr. A 825:149–159.

Makkar R, Cameotra S & Banat I (2011) Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. AMB Express 1:5.

Mata-Alvarez J, Mace S & Llabres P (2000) Anaerobic digestion of organic solid waste: an overview of research achievements and perspectives. Bioresour. Technol. 74: 3–16

Müller M, Küglera J, Henkela M, Gerlitzki M, Hörmanna B, Pöhnleina M, Syldatka Ch & Hausmannb R (2012) Rhamnolipids—Next generation surfactants?. J. Biotechnol. 162(4): 366‑380.

Ortíz-Hernández L, Monterrosas-Brisson M, Yañez-Ocampo G & Sánchez-Salinas E (2001) Biodegradation of methyl-parathion by bacteria isolated of agricultural soil. Rev. Int. Contam. Amb. 17(3):147-155.

Pacwa-Płociniczak M, Płaza G, Piotrowska-Seget Z, Cameotra S (2011) Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 633-654.

Palatsi J, Viñas M, Guivernau M, Fernandez B, Flotats X (2011) Anaerobic digestion of slaughterhouse waste: Main process limitations and microbial community interactions. *Bioresour. Technol.* 102: 2219–2227.

Rahman K & Gakpe E (2008) Production, characterization and applications of biosurfactants – Review. *Biotechnol.* 7(2):360-370.

Reis R, Pacheco G, Pereira A & Freire D (2013) Biosurfactants: Production and Applications. In: Biodegradation - Life of Science. Chamy R &

Rosenkranz F (ed). InTech, ISBN 978-953-51-1154-2. pp. 31-61

Ron E & Rosenberg E (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* 3(4): 229-236

Rosenberg E & Ron E (1999) High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 52:154-162.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2007) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (México). Disponible en: http://www.siap.sagarpa.gob.mx/

Secretaría de Energía (México) (2006): Potenciales y Viabilidad del Uso de Bioetanol y Biodiesel para el Transporte en México; SENER-GTZ-BID, México. Disponible en: http://www.sener.gob.mx/webSener/res/169/Biocombustibles_en_Mexixo_Estudio_Compl

Siles-López JA, Martín MA, Chica AF & Martín A (2009) Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Biores. Technol.*100: 5609–5615.

Singh A, Van Hamme J & Ward O (2007) Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol. Adv.* 25: 99–121.

Smyth T, Perfumo A, Marchant R & Banat I (2010) Isolation and Analysis of Low Molecular Weight Microbial Glycolipids. In: K. N. Timmis (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, DOI 10.1007/978-3-540-77587-4_291.

Soberón-Chávez G, Lépine F & Déziel E (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 718–725.

Supaphol S, Jenkins SN, Intomo P, Waite IS & O'Donnell AG (2011) Microbial community dynamics in mesophilic anaerobic co-digestion of mixed waste. *Bioresour. Technol.* 102: 4021–4027.

Tenca A, Schievano A, Perazzolo F, Adani F & Oberti R (2011) Biohydrogen from thermophilic co-fermentation of swine manure with fruit and vegetable waste: Maximizing stable production without pH control. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2011.03.102

Thavasi R, Subramanyam V, Jayalakshmi N, Balasubramanian T & Banat I (2011) Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* from renewable resources. *I. J. Microbiol.* 51(1):30–36.

Valdez-Vazquez I, Acevedo-Benítez JA & Hernández-Santiago C (2010) Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural

activities in Mexico. *Ren. Sust. Ener. Rev.* 14: 2147–2153.

Yañez-Ocampo G, Sanchez-Salinas E, Jimenez-Tobon G, Penninckx M & Ortiz-Hernandez ML (2009) Removal of two organophosphate pesticides by a bacterial consortium immobilized in alginate or tezontle. *J. Haz. Mat.*168: 1554–1561.

Yañez-Ocampo G, Sanchez-Salinas E & Otríz-Hernandez ML (2011) Removal of methyl parathion and tetrachlorvinphos by a bacterial consortium immobilized on tezontle-packed up-flow reactor. *Biodeg.* DOI 10.1007/s10532-011-9475-z.

Biología Sintética: La Próxima Revolución Industrial

Antonio Bensussen y Angélica Meneses-Acosta*

Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa. Cuernavaca Morelos. CP 62010. E-mail: angelica_meneses@uaem.mx

RESUMEN

Históricamente, diseñar procesos biológicos artificiales al estilo de la ingeniería había parecido un sueño inalcanzable, sin embargo, hoy en día ya es una realidad y la disciplina encargada de hacerlo es la Biología Sintética. El hecho que diferencia a esta área de la ingeniería genética tradicional, es el uso de modelos matemáticos para predecir el comportamiento de sistemas biológicos artificiales, tal como sucede en las ingenierías bien establecidas. Actualmente, sus principales aplicaciones se encuentran en el desarrollo de mejores procesos de producción industrial y en el desarrollo de biofármacos, biocombustibles, biomateriales, etc. e inclusive en la síntesis de bacterias y virus artificiales. La convergencia de la Biología Sintética con otras áreas tales como la biotecnología farmacéutica y la nanotecnología, abre un sinfín de posibilidades para desarrollar tecnología capaz de revolucionar la industria y la humanidad en niveles inesperados. Así, el objetivo de esta revisión es brindar un panorama general en esta materia haciendo incapié en su creación como resultado de la inventiva y curiosidad del hombre; definir los elementos que la componen y mostrar algunas de las aplicaciones actuales para ofrecer las perspectivas de desarrollo en un futuro próximo.

Palabras clave: Biología sintética, ingeniería, diseño biológico.

ABSTRACT

Historically, designing of artificial biological processes using engineering seemed to be an impossible dream, nevertheless, currently this is possible using Synthetic Biology. The fact that distinguishes such an area from the traditional genetic engineering is the use of mathematical models to predict the behavior of artificial biological systems. The main current applications of this novel area are: the establishment of more efficient industrial processes, as well as the development of new biopharmaceuticals, biofuels, biomaterials, etc. and even the synthesis of artificial bacteria and viruses. The convergence of Synthetic Biology with other areas such as pharmaceutical biotechnology and nanotechnology opens a large number of possibilities to revolutionize the industry and humanity at unexpected levels. Thus, the aim of this review is to provide an overview of Synthetic Biology, with emphasis on its creation as a result of human inventiveness and curiosity;

defining the elements that play an important role in its development, and showing some of its current applications, in order to offer a better perspective of its use in the near future.
Key words: Synthetic biology, engineering, biologic design.

SURGIMIENTO DE LA BIOLOGÍA SINTÉTICA

A partir del desarrollo industrial vivido por la humanidad desde mediados del siglo XVIII hasta nuestros días, un problema recurrente durante siglos ha sido hallar nuevas y mejores formas de optimizar los procesos productivos, tanto para ahorrar costos de inversión como para maximizar el margen de beneficios (Fraser, 1973). Este problema ha sido, en gran medida, el motor del desarrollo tecnológico imperante durante esta era. Sin embargo, hay que señalar que como resultado de los avances tecnológicos sin control, actualmente la humanidad se enfrenta a nuevos desafíos tales como la escasez de materias primas (recursos naturales), la extinción de antiguos ecosistemas, el cambio climático y la contaminación ambiental (Fraser, 1973; Swilling, 2013; Wang Y & Liang, 2013). Estos fenómenos inesperados añaden nuevos problemas al sector industrial, ya que ahora se debe maximizar a eficiencia en la administración de los recursos naturales para mantener una producción rentable (Wang Y & Liang, 2013).

Para la industria biotecnológica, esto supone un nicho de oportunidad para el desarrollo de fuentes de energía alternativa, optimización de sistemas de producción de metabolitos, desarrollo de tecnologías para fortalecer la producción agroindustrial, etcétera. Aparentemente la ingeniería genética convencional es la clave para desarrollar tecnología eficiente para solucionar la problemática contemporánea, sin embargo, en la práctica se ha visto que existen limitantes importantes tales como el desconocimiento de los efectos fisiológicos que tiene el suministro genes externos a nivel celular, tisular y sistémico. El impacto de este problema queda de manifiesto con las historias de éxito (Blaese *et al.,* 1995) y de fracaso (Hacein-Bey-Abina et al., 2008) de la terapia génica. Por consiguiente, debe encontrarse la forma de optimizar a la ingeniería genética para poder usar todo su potencial. Idealmente, la forma de perfeccionar la ingeniería genética sería el poder diseñar procesos biológicos artificiales, controlables y predecibles; tal como las ingenierías convencionales diseñan toda clase de sistemas. Con miras a alcanzar este ideal escenario ha surgido un área emergente llamada Biología Sintética, cuyo objetivo consiste precisamente en la creación de procesos biológicos artificiales al estilo de la ingeniería (Endy, 2005; Cheng & Lu, 2012).

Para sorpresa de muchos, el concepto de la Biología Sintética es más viejo que el

descubrimiento de la ingeniería genética en sí. De hecho, su origen tiene más de cien años de antigüedad, y fue expuesto por primera vez en el libro "*La Biologie Synthétique, étude de biophysique"* (1912) del visionario francés, Stéphane Leduc. En este trabajo se postulaba que la biología podía ser explicada en base a las leyes fundamentales de la química y de la física; asimismo, se afirmaba que los sistemas biológicos debían ser estudiados con modelos matemáticos para obtener información a profundidad de los mismos y también dejaba abierta la posibilidad de que algún día, estos sistemas podrían ser creados de manera racional por la ingeniería, tal como ocurría con los sistemas mecánicos (Leduc, 1912). Los campos de aplicación que Leduc propuso para la Biología Sintética eran los sistemas dinámicos aplicados a la biología, síntesis de células, síntesis de tejidos, organogénesis, biomecánica, bioenergía, fisiología, desarrollo y el procesamiento sensorial de la información (Leduc, 1912). Desafortunadamente el sueño de Leduc no prosperó en su tiempo, básicamente porque la Biología Sintética en ese momento no podía cumplir con los requisitos básicos de una ingeniería convencional, los cuales son: 1) tener uno o más tipos de sistemas para estudiarlos con modelos matemáticos, por ejemplo sistemas térmicos y/o mecánicos (Ogata, 2010; Boukas & Sunni, 2011); 2) contar con métodos para construir, evaluar y optimizar dispositivos para trabajar con los sistemas de interés (Ogata, 2010; Boukas & Sunni, 2011); y finalmente, 3) usar a la ingeniería de control para manipular los sistemas de elección (Ogata, 2010) (Fig. 1). Para beneplácito de Leduc, lo que hasta hace un par de décadas parecía una auténtica utopía, ya es una realidad en gran medida por los adelantos tecnológicos realizados en el estudio de las propiedades de los sistemas biológicos (biología de sistemas y ómicas) (Klipp *et al*., 2005; Fazenda *et al*., 2013), por el desarrollo de nuevos métodos para sintetizar "*dispositivos biológicos*" (ingeniería genética) (Falke *et al*., 2002; Endy, 2005; Sayut *et al*., 2009; Sleight *et al*., 2010; Callura et al., 2012; Cheng & Lu, 2012), y por el estudio de las propiedades de regulación biológica (Kremling & Saez-Rodriguez, 2007; Iglesias & Ingalls, 2010; Cosentino & Bates, 2012) necesarias para establecer sistemas de control.

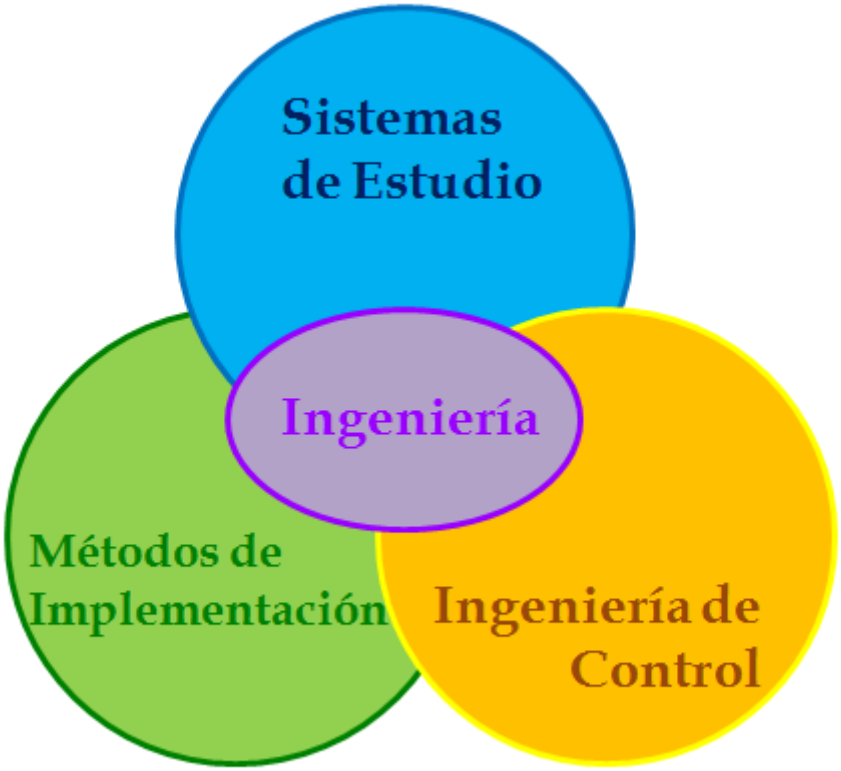


Fig. 1 Características de la ingeniería tradicional. Todas las ingenierías convencionales tienen un grupo de sistemas de estudio, para los cuales se diseñan estrategias para manipularlos mediante la ingeniería de control, y finalmente se cuenta con métodos prácticos para tomar el control de dichos sistemas en la forma deseada.

Esto no quiere decir que la Biología Sintética actualmente sea una ingeniería totalmente formada; en realidad se trata de un área en crecimiento continuo (Endy, 2005; Cheng & Lu, 2012). De hecho, en los últimos 20 años se han realizado esfuerzos por mejorar la creación de dispositivos biológicos, los cuales no son otra cosa que grupos de biomoléculas con la capacidad de ejecutar alguna función determinada (Voigt, 2006; Stratton & Loh, 2011; Wang B *et al*., 2011). Interesantemente estos dispositivos pueden realizar funciones de la misma manera que los dispositivos convencionales, por ejemplo, es posible crear filtros y amplificadores (Basu *et al*., 2005; Ajo-*Franklin et al.,* 2007) al estilo de la electrónica. Los dispositivos biológicos están construidos con interacciones intracelulares y las señales son de tipo bioquímico en lugar de eléctricas (Fig. 2). Cabe señalar que los dispositivos biológicos pueden ser

construidos para que funcionen en todos los niveles de regulación biológica, desde las redes genéticas artificiales (Berens & Hillen., 2003; Buchler *et al*., 2003; Ameres et al., 2005; Guido *et a*l., 2006; Buchler & Cross, 2009), pasando por los riboreguladores (Win & Smolke, 2008; Lucks *et al*., 2011), por las redes metabólicas de diseño (Lee *et al*., 2012; Fazenda *et al*., 2013), hasta por las vías de señalización artificiales (Yeh et al., 2007), llegando inclusive hasta sistemas de comunicación célula-célula (Basu *et al*., 2005; *Dannino et al*., 2010; Ortiz & Endy, 2012). Así, la Biología Sintética ofrece un mundo de posibilidades para crear toda clase de procesos; y por consiguiente la pregunta es: ¿Y cómo lo hace?

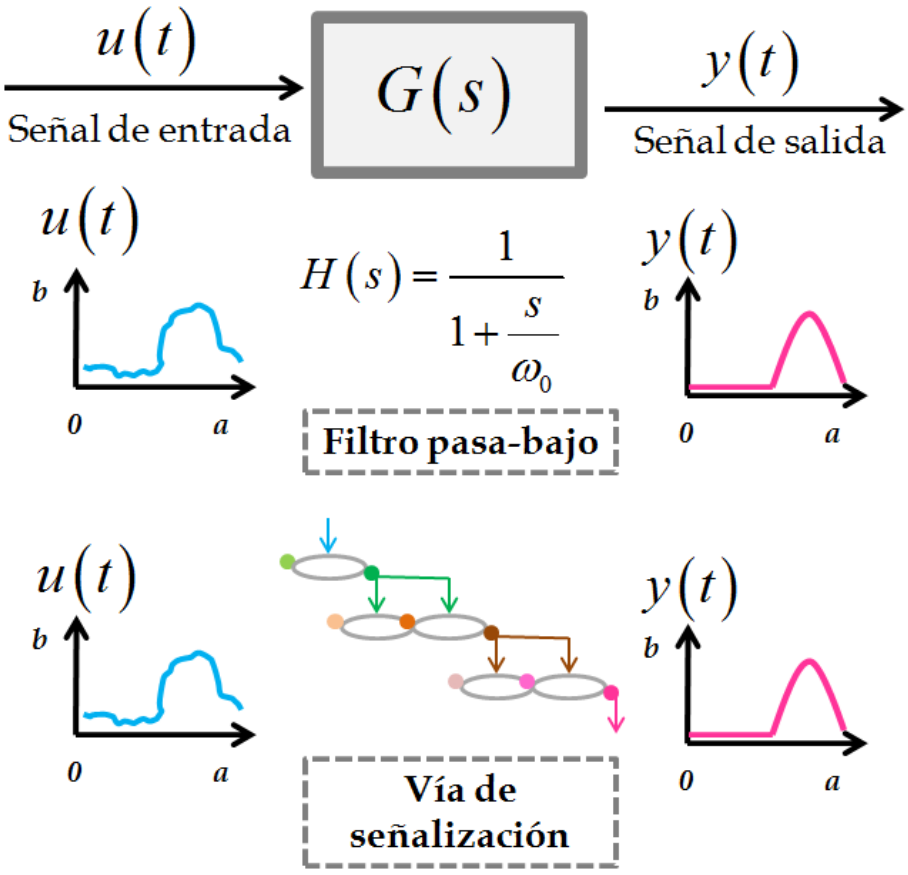


Fig. 2 Propiedades de los sistemas. Al igual que los sistemas mecánicos, eléctricos, y termodinámicos; los sistemas biológicos cumplen con propiedades dinámicas que sirven para confeccionar toda clase de dispositivos. En la figura se esquematizan las propiedades de un filtro pasa-bajo, es decir, un filtro que nulifica todas las señales inferiores a cierto umbral, comparadas con el funcionamiento mecánico de una de señalización al estilo de las MAP cinasas.

ELEMENTOS QUE COMPONEN LA BIOLOGÍA SINTÉTICA

Como cualquier otra ingeniería, la Biología Sintética tiene una fase de análisis, en la cual se debe estudiar el sistema de interés usando el conocimiento disponible al respecto, junto con modelos matemáticos para visualizar el comportamiento del sistema (Ogata, 2010; Boukas & Sunni, 2011). Los modelos más usados en Biología Sintética son los modelos de variables continuas, de entre los cuales se destacan los sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias, aunque también se pueden usar sistemas de ecuaciones diferenciales parciales, modelos discretos, y modelos estocásticos (Klipp, 2005). Después se pasa a la fase de diseño, en la cual se proponen muchas posibles soluciones para el problema a resolver; se evalúan todas estas propuestas usando análisis matemáticos y herramientas computacionales, y se elige a la o las mejores propuestas para implementarse (Ogata, 2010; Boukas & Sunni, 2011). Finalmente, en la fase de implementación, se construyen los dispositivos seleccionados por la teoría, se prueban experimentalmente y se ajustan para obtener el rendimiento deseado (Ogata, 2010; Boukas & Sunni, 2011). A simple vista podría parecer muy complicado todo este procedimiento, sin embargo, desde 1922 se sabe que usar esta metodología permite ahorrar tiempo, recursos y esfuerzo a la hora de construir dispositivos nuevos (Ajo-Franklin et al., 2007; Ogata, 2010).

Ciertamente, para desarrollar vías metabólicas artificiales y todos esos sistemas complejos, se requiere de estructuras de control bien definidas. Sin embargo, en Biología Sintética hay pocos trabajos que aborden a profundidad el ensamblaje de sistemas de control *per se* (Oldham *et al*., 2012). Los sistemas de control permiten manipular un proceso de interés articulando varios dispositivos auxiliares como son los controladores, los actuadores y los sensores (Ogata, 2010; Cosentino & Bates, 2012). Los controladores son dispositivos que se encargan de dirigir el funcionamiento general del proceso mandando señales de control a los actuadores y recibiendo señales de entrada desde el exterior (Ogata, 2010; Boukas & Sunni, 2011; Cosentino & Bates, 2012). Los actuadores son dispositivos que cambian físicamente el funcionamiento del proceso de interés (Ogata, 2010; Cosentino & Bates, 2012), y finalmente los sensores se encargan de medir la calidad de la respuesta emitida por el proceso de interés, con la finalidad de mandarle los datos al controlador para que éste mande "*instrucciones*" para modificar el funcionamiento del sistema (Ogata, 2010; Boukas & Sunni, 2011; Cosentino & Bates, 2012). A grandes rasgos los sistemas de control pueden contar con la retroalimentación proporcionada por sensores (estructura de lazo cerrado) o

prescindir de ella (estructura de lazo abierto, Fig. 3) (Cosentino & Bates, 2012).

Un magnífico ejemplo de un sistema de control biológico fue el trabajo realizado por Win y Smolke (2008). En dicho trabajo se desarrolló una dispositivo de RNA con una estructura de control de lazo abierto, para regular la expresión de una proteína (Fig. 3). En este caso el proceso a controlar es la expresión de una proteína, el actuador es una ribozima fusionada al mRNA de la proteína de interés, que constitutivamente se está autodegradando, y el controlador es una estructura de RNA fusionada al actuador. En presencia de un metabolito inductor (señal de entrada), el controlador induce un cambio conformacional en el actuador, evitando la autodegradación de la ribozima, y por consiguiente se permite la traducción del mRNA a proteína (Win & Smolke, 2008).

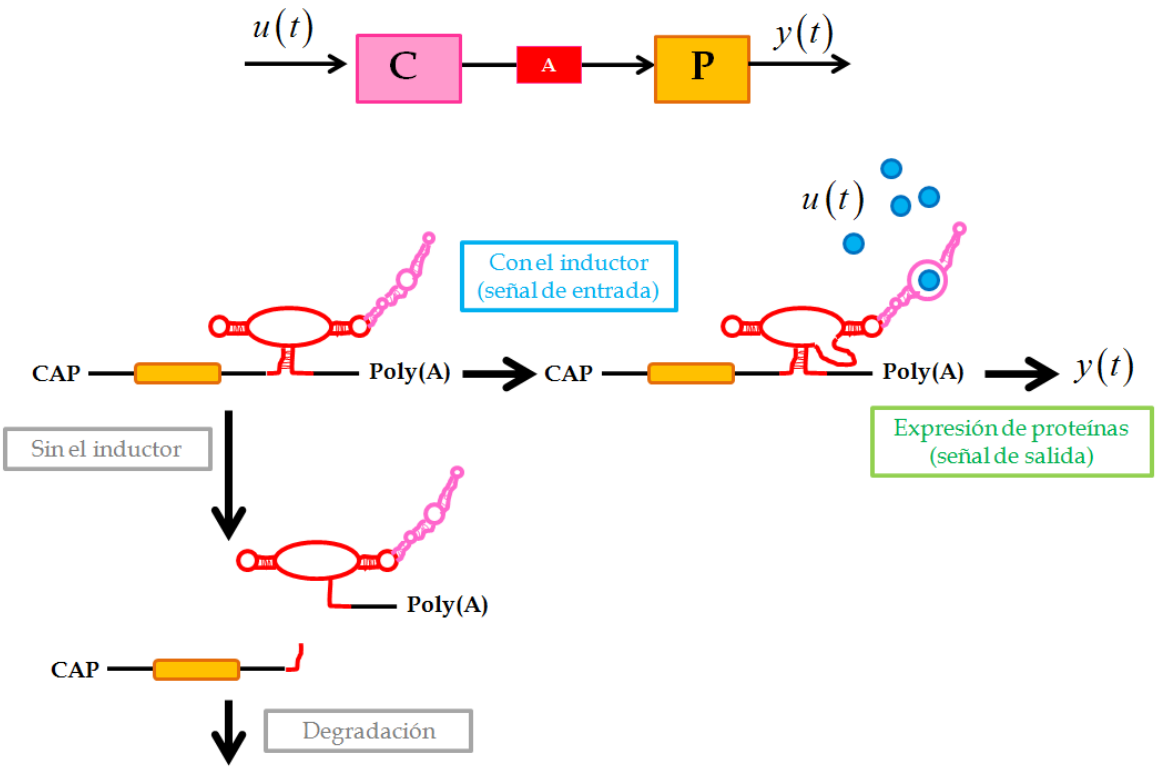


Fig. 3 Dispositivo biológico fabricado con RNAs (Win & Smolke, 2008). En presencia del inductor, el controlador (estructura de RNA) cambia su conformación, y en respuesta a este estímulo, el actuador (ribozima) permite la traducción de un mRNA. Este mecanismo recuerda mucho a un sistema de control de lazo abierto (parte superior).

APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA SINTÉTICA

A pesar de no estar completamente formada, la Biología Sintética está siendo usada para crear toda clase de aplicaciones; muchas de ellas encaminadas a solucionar la problemática mencionada al principio de este artículo. Por ejemplo, hoy en día se usa para desarrollar nuevas cepas para producción (Ming *et al*., 2010); algunas con capacidades bastante singulares como por ejemplo, la capacidad de alternar la producción de metabolitos (Callura *et al*., 2010), otras con la capacidad de auto-regularse (Beisel et al., 2008; Dragosits *et al*., 2012) o con la capacidad de ajustar sus tiempos de producción (Ellis *et al*., 2009); inclusive con la capacidad de "recordar que ya han sido activadas" y mantener la expresión de una proteína de interés indefinidamente (Ajo-Franklin *et al*., 2007). El enfoque ingenieril de la Biología Sintética también se usa para optimizar fermentaciones industriales (Moser *et al*., 2012; Marisch *et al*., 2013), para optimizar los procesos de manufactura y diseño de RNAs de interferencia (Fellmann et al., 2011); para desarrollar nuevos biocombustibles (Stephanopoulos, 2007); para producir nuevos biomateriales (Xia *et al.,* 2010); para potenciar la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa (Carey *et al*., 2008); para desarrollar sistemas de producción de fármacos convencionales (Medema et al., 2011) y de vacunas (Kindsmüller & Wagner, 2011); y, en la síntesis de nuevos biofármacos para combatir enfermedades: neurológicas (Tang *et al*., 2009; Garriga-Canut *et al*., 2012), metabólicas (Ye *et al*., 2013), cáncer (Falke *et al*., 2002), tuberculosis, malaria, e infección por VIH (Kindsmüller & Wagner, 2011), e inclusive algunos de los biofármacos más sorprendentes están enfocados en la restitución de la visión para ciertos tipos de ceguera (Verrier *et al*., 2011) y para eliminar bacterias resistentes a antibióticos (Lu & Collins, 2009). Ahondando un poco más en este punto; Lu & Collins (2009) en un intento por crear biofármacos para combatir genéricamente el problema de las cepas bacterianas resistentes a antibióticos, diseñaron versiones modificadas del bacteriófago M13 con la capacidad de expresar, en presencia de antibióticos, genes para interferir con la respuesta SOS (lexA), genes capaces de potenciar el daño por estrés oxidativo (SoxR) y genes para facilitar la entrada de antibióticos en las células bacterianas (OmpF). Interesantemente, estos biofármacos mostraron resultados prometedores al ser evaluados en ensayos *in vivo*; no obstante, el aspecto más resaltable de este trabajo es que en él se plantea la posibilidad de diseñar a través de la Biología Sintética, nuevos biofármacos más precisos contra toda clase de padecimientos, sin importar su grado de complejidad (Lu & Collins, 2009).

Por otra parte, aplicaciones menos ortodoxas de la Biología Sintética se enfocan

a la transformación de células tumorales en microgeneradores de electricidad (Justin *et al*., 2011); al diseño de células artificiales productoras de energía (Xu & Lavan, 2008); y, al desarrollo de hojas artificiales para ser usadas como paneles solares altamente eficientes (Bar-Even *et al*., 2010; Barber & Tran, 2013), de células artificiales con sistemas de control híbridos, en los cuales se usan genes como controladores y nanomáquinas como actuadores (Franco *et al*., 2011), y finalmente de bacterias (Gibson *et al*., 2008) y virus artificiales (Jaschke *et al*., 2012). Un interesante ejemplo de estas aplicaciones de tipo no ortodoxo, se reporta en el trabajo realizado por Franco y colegas (2011); cuya investigación se enfocó en recrear osciladores biológicos en sistemas libres de células. Para lograr este fin, ellos acoplaron entre sí a varias nanomáquinas conocidas como "*pinzas de DNA*". Estos dispositivos de DNA estaban compuestos por dos dominios de doble cadena en los que se encontraban genes para RNAs no codificantes conectados por una bisagra; en la región promotora de cada dominio de doble cadena, había un dominio de cadena sencilla conocido como "mano", que era capaz de unirse a un oligonucleótido blanco para cerrar la pinza e iniciar la transcripción del RNA no codificante. Sorprendentemente, al sincronizar varias pinzas de DNA, además de crear un oscilador, ellos fueron capaces de controlar el periodo y la amplitud de las oscilaciones presentadas en las concentraciones de los RNAs no codificantes (Franco *et al*., 2011). Pese a ser un trabajo que no se realizó en células, el estudio plantea la posibilidad de crear sistemas de control biológicos capaces de coordinar simultáneamente varios procesos, y eventualmente, esto podría conllevar a la creación de organismos completamente artificiales, con funciones y propiedades verdaderamente únicas.

Es interesante observar como a medida de que la Biología Sintética se desarrolla, comienza a interaccionar con sistemas mecatrónicos convencionales para formar mejores paneles solares (Barber & Tran, 2013), y con sistemas nanotecnológicos para crear células artificiales (Doktycz & Simpson, 2007; Jungmann et al., 2008). Por consiguiente, en un futuro no muy lejano la visión de Leduc será superada por la realidad, y la Biología Sintética revolucionará el mundo industrial de formas insospechadas. Es altamente probable que la Biología Sintética en conjunto con las ingenierías bien establecidas, puedan resolver los problemas asociados a los retos económicos que vivimos actualmente, y logren crear la tecnología requerida para suplir al petróleo, reciclar los materiales intratables, descontaminar el medio ambiente e inclusive generar microclimas en pro de la vida en la tierra y el desarrollo industrial sustentable. En nuestro laboratorio se estudia a profundidad el diseño de sistemas de control biológico no-lineales de múltiples entradas y múltiples salidas, con la finalidad de aplicar este

conocimiento en la creación de biofármacos más eficaces contra la infección del VIH, agente causal del SIDA.

REFERENCIAS

Ajo-Franklin CM, Drubin DA, Eskin JA, Gee EPS, Landgraf D, Phillips I & Silver PA (2007) Rational design of memory in eukaryotic cells. *Genes Dev*. 21: 2271–2276.

Ameres SL, Drueppe L, Pfleiderer K, Schmidt A, Hillen W & Berens C (2005) Inducible DNA-loop formation blocks transcriptional activation by an SV40 enhancer. *EMBO J*. 24: 358–367.

Barber J & Tran PD (2013) From natural to artificial photosynthesis. *J. R. Soc. Interface*. 10:20120984.

Bar-Even A, Noor E, Lewis NE, & Milo R (2010) Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways. *PNAS*. 107: 8889–8894.

Basu S, Gerchman Y, Collins CH, Arnold FH, & Weiss R (2005) A synthetic multicellular system for programmed pattern formation. *Nature*. 434: 1130–1134.

Beisel CL, Bayer TS, Hoff KG & Smolke CD (2008) Model-guided design of ligand-regulated RNAi for programmable control of gene expression. *Mol Sys Biol*. 4:224

Berens C & Hillen W (2003) Gene regulation by tetracyclines: Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur. J. Biochem.* 270: 3109–3121.

Blaese RM, Culver KW & Miller AD (1995) T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science*. 270: 475 – 480

Boukas E & Sunni F (2011) Design Based on Transfer Function. *In*: Mechatronic systems: analysis, design and implementation. Berlin Heidelberg: Springer. pp. 129-212

Buchler NE & Cross FR (2009) Protein sequestration generates a flexible ultrasensitive response in a genetic network. *Mol Sys Biol*. 5:272.

Buchler NE, Gerland U & Hwa T (2003) On schemes of combinatorial transcription logic. *PNAS*. 100: 5136–5141.

Callura JM, Cantor CR & Collins JJ (2012) Genetic switchboard for synthetic biology applications. *PNAS*. 109: 5850–5855.

Callura JM, Dwyer DJ, Isaacs FJ, Cantor CR & Collins JJ (2010) Tracking, tuning, and terminating microbial physiology using synthetic riboregulators. *PNAS*. 107: 15898–15903.

Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, Saha K, Gao Q, Mitalipova M & Jaenisch R (2008) Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *PNAS*. 106: 157–162.

Cheng A & Lu TK (2012) Synthetic Biology: An Emerging Discipline. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 14:155–78

Cosentino C & Bates D (2012) Feedback control in systems biology. Boca Raton: CRC Press. pp.1-181.

Doktycz MJ & Simpson ML (2007) Nano-enabled synthetic biology. *Mol Sys Biol*. 3:125.

Dragosits M, Nicklas D & Tagkopoulos I (2012) A synthetic biology approach to self-regulatory recombinant protein production in *Escherichia coli*. *J Biol Eng*. 6:2.

Ellis T, Wang X & Collins JJ (2009) Diversity-Based, Model-Guided Construction of Synthetic Gene Networks with Predicted Functions. *Nat Biotechnol*. 27: 465–471.

Endy D (2005) Foundations for engineering biology. *Nature*. 438: 449 – 453.

Falke D, Fisher M, Ye D & Juliano RL (2002) Design of artificial transcription factors to selectively regulate the pro-apoptotic bax gene. *Nucl Acids Res*. 31(3):e10.

Fazenda ML, Dias JM, Harvey LM, Nordon A, Edrada-Ebel R, LittleJohn D & McNeil B. (2013). Towards better understanding of an industrial cell factory: investigating the feasibility of real-time metabolic flux analysis in Pichia pastoris. *Micro Cell Fac*. 12:51.

Fellmann C, Zuber J, McJunkin K, Chang K, Malone CD, Dickins RA, Xu Q, Hengartner MO, Elledge SJ, Hannon GJ, & Lowe SW (2011) Functional Identification of Optimized RNAi Triggers Using a Massively Parallel Sensor Assay. *Mol Cell.* 41:733–746.

Franco E, Friedrichs E, Kim J, Jungmann R, Murray R, Winfree E & Simmel FC (2011) Timing molecular motion and production with a synthetic transcriptional clock. *PNAS*. 108: E784–E793.

Fraser D (1973). The evolution of the British Welfare State; a history of social policy since the Industrial Revolution. London: Macmillan. pp.1-161

Garriga-Canut M, Agustín-Pavón C, Herrmann F, Sáncez A, Dierssen M, Fillat C & Isalan M (2012) Synthetic zinc finger repressors reduce mutant huntingtin expression in the brain of R6/2 mice. *PNAS*. E3136–E3145.

Gibson DG, Benders GA, Axelrod KC, Zaveri J, Algire MA, Moodie M, Montague MG, Venter JC, Smith HO & Hutchison CA (2008) One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic Mycoplasma genitalium genome. *PNAS*. 105: 20404–20409.

Guido NJ, Wang X, Adalsteinsson D, McMillen D, Hasty J, Cantor CR, Elston TC & Collins JJ (2006) A bottom-up approach to gene regulation. *Nature*. 439: 856–860.

Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, Clappier E, Caccavelli L, Delabesse E, Beldjord K, Asnafi V, MacIntyre E, Cortivo LD, Radford I, Brousse N, Sigaux F, Moshous D, Hauer J, Borkhardt A, Belohradsky BH, Wintergerst U, Velez MC, Leiva L, Sorensen R, Wulffraat N, Blanche S, Bushman FD, Fischer A & Cavazzana-Calvo M (2008) Insertional oncogenesis

in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*. 118: 3132–3142.

Iglesias P & Ingalls B (2010) A Primer on Control Engineering. *In:* Control theory and systems biology (EIB). Cambridge, Mass: MIT Press. pp. 1-28

Jaschke PR, Lieberman EK, Rodríguez J., Sierra A & Endy D (2012) A full decompressed synthetic bacteriophage øX174 genome assembled and archived in yeast. *Virol*, 434: 278–284.

Jungmann R, Renner S & Simmel FC (2008) From DNA nanotechnology to synthetic biology. *HFSP J.* 2:99–109.

Justin GA, Zhang Y, Cui XT, Bradberry CW, Sun M & Sclabassi RJ (2011) A Metabolic Biofuel Cell: Conversion of Human Leukocyte Metabolic Activity to Electrical Currents. *J Biol Eng*. 5:5.

Kindsmüller K & Wagner R (2011) Synthetic biology: impact on the design of innovative vaccines. *Hum Vac*. 7: 658–662.

Klipp E, Herwig R, Kowald A, Wierling C & Lehrach H. (2005) Systems biology in practice: concepts, implementation, and application. Weinheim: Wiley-VCH. pp. 3-103

Kremling A & Saez-Rodriguez J (2007) Systems biology—An engineering perspective. *J Biotechnol.* 129: 329–351.

Leduc S (1912) La biologie synthétique, étude de biophysique. Ed. Poinat A.

Lee SY, Mattanovich D & Antonio Villaverde A (2012) Systems metabolic engineering, industrial biotechnology and microbial cell factories. *Micro Cell Fac*. 11:156.

Lu TK & Collins JJ (2009) Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *PNAS*. 106: 4629–4634.

Lucks JB, Qi L, Mutalik VK, Wang D & Arkin AP (2011) Versatile RNA-sensing transcriptional regulators for engineering genetic networks. *PNAS*. 108: 8617–8622.

Marisch K, Bayer K, Cserjan-Puschmann M, Luchner M & Striedner G. (2013). Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. *Micro Cell Fac*. 12:58.

Medema MH, Breitling R, Bovenberg R & Takano E (2011) Exploiting plug-and-play synthetic biology for drug discovery and production in microorganisms. *Nat Microbiol*. 9:131–137.

Ming YM, Wei ZW, Lin CY & Sheng GY. (2010). Development of a Bacillus subtilis expression system using the improved Pglv promoter. *Mic. Cell Fac*. 9:55.

Moser F, Broers NJ, Hartmans S, Tamsir A, Kerkman R, Roubos JA, Bovenberg R & Voigt CA (2012) Genetic Circuit Performance under Conditions Relevant for Industrial Bioreactors. *ACS Synth. Biol.* 1: 555–564.

Ogata K. (2010). Modern control engineering. Boston, MA: Prentice-Hall. pp.1-40

Oldham P, Hall S & Burton G (2012) Synthetic Biology: Mapping the Scientific Landscape. PLoS ONE 7(4): e34368.

Ortiz ME & Endy D (2012) Engineered cell-cell communication via DNA messaging. *J Biol Eng*. 6:16.

Sayut DJ, Niu Y & Sun L (2009) Construction and Enhancement of a Minimal Genetic ADN Logic Gate. *ACS Chem. Biol.* 75: 637–642.

Sleight SC, Bartley BA, Lieviant JA & Sauro HM (2010) Designing and engineering evolutionary robust genetic circuits. *J Biol Eng*. 4:12.

Stephanopoulos G (2007) Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science*. 315: 801–804.

Stratton MM & Loh SN (2011) Converting a protein into a switch for biosensing and functional regulation. *Prot Sci*. 20:19—29.

Swilling M (2013) Economic crisis, long waves and the sustainability transition: An African perspective. *Env. Inn. & Soc. Trans*. 6:96-115

Tang W, Ehrlich I, Wolff SBE, Michalski AM, Wölfl S, Hasan MT, Lüthi A & Sprengel R (2009) Faithful Expression of Multiple Proteins via 2A-Peptide Self- Processing: A Versatile and Reliable Method for Manipulating Brain Circuits. *J Neurosci*. 29: 8621– 8629.

Verrier JD, Madorsky I, Coggin WE, Geesey M, Hochman M, Walling E, Daroszewski D, Eccles KS, Ludlow R, Semple-Rowland SL. (2011). Bicistronic Lentiviruses Containing a Viral 2A Cleavage Sequence Reliably Co-Express Two Proteins and Restore Vision to an Animal Model of LCA1. *PLoS ONE*. 6(5): e20553.

Voigt CA (2006) Genetic parts to program bacteria. *Curr Opin Biotechnol.* 17:548–557.

Wang B, Kitney RI, Joly N & Buck M (2011) Engineering modular and orthogonal genetic logic gates for robust digital-like synthetic biology. *Nat Comm.* 2:508.

Wang Y & Liang S. (2013). Carbon dioxide mitigation target of China in 2020 and key economic sectors. *Energ. Pol*. 58:90-96.

Win MN & Smolke CD (2008) Higher-order cellular information processing with synthetic RNA devices. *Science*. 322: 456–460.

Xia XX, Qian ZG, Ki CS, Park YH, Kaplan DK & Lee SY (2010) Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. *PNAS*. 107: 14059-14063.

Xu J, & Lavan DA (2008) Designing artificial cells to harness the biological ion concentration gradient. *Nat Nanotechnol*. 3: 666–670.

Ye H, Charpin-El Hamri G, Zwicky K, Christen M, Folcher M & Fussenegger M (2013) Pharmaceutically controlled designer circuit for the treatment of the metabolic syndrome. *PNAS*. 110: 141–146.

Yeh BJ, Rutigliano RJ, Deb A, Bar-Sagi D & Lim WA. 2007. Rewiring cellular

morphology pathways with synthetic guanine nucleotide exchange factors. *Nature*. 447: 596–600.

Avances en la Aplicación de Mediadores Redox Durante la (Bio)Transformación de Contaminantes Recalcitrantes

Luis H. Alvarez[1,2]*, Francisco J. Cervantes[3], Pablo Gortares[1]

[1]Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON), 5 de Febrero 818 Sur, C.P. 85000 Col. Centro, Ciudad Obregón, Sonora, México.

*[2]Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Av. Pedro de Alba S/N. 66451, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. *Correspondencia: luish.alvarezv@gmail.com*

[3]División de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICyT), Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4ª. Sección, C. P. 78216, San Luis Potosí, SLP, México.

RESUMEN

Durante las últimas dos décadas se ha demostrado que el uso de sustancias húmicas (SH) y sus análogos quinonas pueden actuar como mediadores redox (MR) incrementado la velocidad de reducción de una amplia gama de contaminantes recalcitrantes como colorantes azo, compuestos nitroaromáticos y solventes polihalogenados. Sin embargo, es necesario implementar estrategias que permitan inmovilizar los MR en sistemas de tratamiento de aguas residuales a fin de evitar su uso de forma continua. Además, es importante considerar la selección de MR apropiados (efectivos y de bajo costo) como las SH, las cuales contienen una gran cantidad de grupos quinona y pueden ser extraídas de distintos ambientes terrestres y acuáticos. En este trabajo se presentan los avances en el uso de MR inmovilizados, así como las opciones que pueden permitir la selección y aplicación de SH en procesos de biotransformación reductiva de contaminantes.

Palabras clave: sustancias húmicas, mediadores redox, (bio)transformación, inmovilización.

ABSTRACT

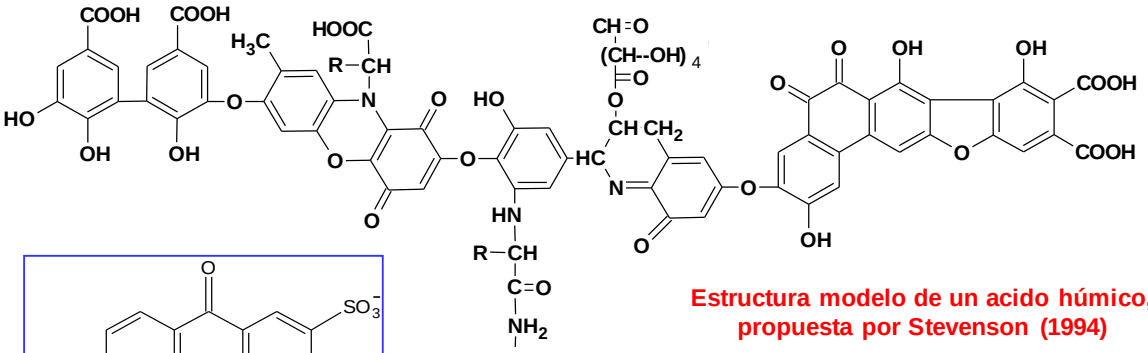
During the last two decades it has been demonstrated that humic substances (HS) and their quinone analogues can act as redox mediators (RM) accelerating the reduction rates of different

recalcitrant pollutants such as azo dyes, nitroaromatic compounds, and polyhalogenated solvents. Nevertheless, it is necessary to develop suitable strategies to immobilize RM in wastewater treatment systems in order to prevent the addition of continuous doses. In addition, it is important to consider the selection of suitable RM (cost-effective) such as HS, which contain large amount of quinone groups and also because can be extracted from different terrestrial and aquatic environments. This study presents advances on the use of immobilized RM, and also the options allowing the selection and application of HS in reductive biotransformation of pollutants.

Key words: humic substances, redox mediators, biotransformation, immobilization

INTRODUCCIÓN

Las sustancias húmicas (SH) representan la fracción más abundante de materia orgánica acumulada en ambientes acuáticos y terrestres. Son compuestos poliméricos con estructuras amorfas y alto peso molecular que se producen a partir de la descomposición de materia orgánica presente en el suelo, proveniente principalmente de plantas. Las SH contienen un gran número de anillos aromáticos y otras estructuras alifáticas (Fig. 1) que son muy recalcitrantes a la biodegradación, lo cual es evidente por los largos tiempos de residencia en el suelo, que pueden variar desde 250 a 1900 años (Stevenson, 1994). Sin embargo, las SH no son estructuras inertes, de hecho, debido a las características que le confieren sus grupos funcionales como los cetónicos, carboxílicos, aminos y quinonas, se involucran en procesos microbiológicos, químicos y físicos.



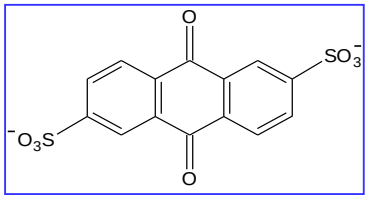


Fig. 1. Mediadores redox utilizados en procesos de biotransformación de contaminantes.

La presencia de grupos funcionales con capacidad redox (como las quinonas) presentes en las SH le confieren tres funciones importantes: 1) como aceptor final de electrones para la respiración microbiana; 2) como mediador redox (MR, acarreador de electrones) entre un donador de electrones y un compuesto aceptor de electrones, ya sea en procesos químicos y/o microbiológicos; y 3) como donador de electrones para la reducción microbiológica de aceptores de electrones mas oxidados, impactando significativamente en la conversión redox y destino de distintos contaminantes orgánicos e inorgánicos. A la fecha han sido reportados una gran variedad de microorganismos capaces de reducir SH o quinonas modelo. La mayoría de los microorganismos reductores del humus son bacterias y arqueas reductoras del hierro, en donde también se pueden incluir microorganismos desnitrificantes, sulfato-reductores, halorespiradores, metanogénicos y fermentativos (Martínez *et al*. *2013a*). La Fig. 2 presenta las reacciones bióticas (microbiológicas) y abióticas presentes en la reducción y oxidación de MR. La diversidad microbiana capaz de utilizar SH en sus procesos respiratorios, y la capacidad de éstas en ceder electrones para la reducción de contaminantes recalcitrantes, representan un potencial biotecnológico importante que puede permitir el mejoramiento de los sistemas de tratamiento de aguas residuales de la industria química, petroquímica y textil. Sin embargo, es necesario vencer algunos retos antes de intentar aplicar las SH en sistemas de tratamiento de aguas residuales a escala real. En este trabajo se presentan los avances en el uso de MR, incluyendo SH, quinonas modelo y materiales carbonáceos; así como el uso de fuentes adecuadas de SH y su aplicación en la biotransformación de contaminantes electrofílicos como colorantes azo, compuestos nitroaromáticos y solventes polihalogenados, los cuales son descargados por industrias como la petroquímica, química y textil.

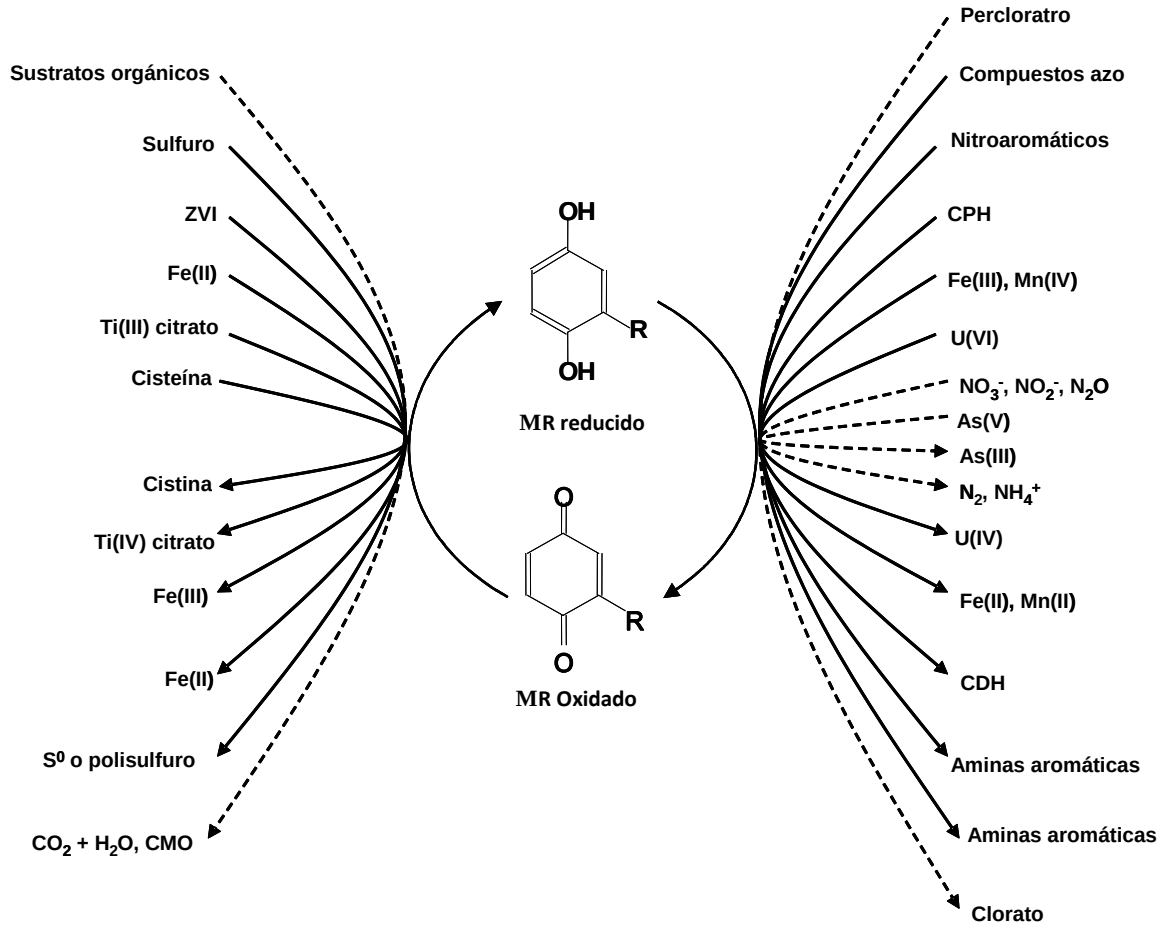


Fig. 2. Mecanismo propuesto para la reducción anaerobia de contaminantes electrofílicos y Fe(III) utilizando mediadores redox. CMO, compuestos más oxidados; CPH, compuestos polihalogenados; CDH, compuestos deshalogenados; CN, compuestos nitroaromáticos. (Van der Zee & Cervantes, 2009).

EL USO DE SUSTANCIAS HUMICAS COMO MEDIADORES REDOX

En muchos estudios se ha indicado que el grupo principalmente responsable de la capacidad de transferencia de electrones en el humus son las quinonas (Field *et al*., 2000). Sin embargo, se ha reportado que algunos grupos no quinona también participan en la transferencia de electrones (Hernández *et al*., 2012; Ratasuk & Nanny, 2007). La capacidad de las SH de actuar como MR se debe a reacciones oxido-reducción entre sus grupos redox reactivos con un donador y/o aceptor final de electrones. Este proceso permite que las quinonas puedan ser recicladas para estar nuevamente disponibles (Fig. 2).

La capacidad de transferencia de electrones de las quinonas y/o SH puede ser utilizada para soportar la transformación reductiva de contaminantes electrofílicos como colorantes azo, compuestos nitroaromáticos y compuestos halogenados, actuando como MR en reacciones que pueden ser bióticas (microbiológicas) y abióticas (Fig. 2). La presencia de MR incrementa la velocidad de reducción de los contaminantes electrofílicos en varios órdenes de magnitud, y en algunos casos es un requisito esencial para que ocurra la reacción. Van der Zee & Cervantes (2009) publicaron un interesante artículo en donde muestran que el pH, temperatura, potencial redox, donadores de electrones y origen de las SH, están directamente relacionados con el papel que tienen estos MR durante transformaciones reductivas bióticas o abióticas. Por ejemplo, las SH deberán tener un potencial redox ubicado entre el potencial del contaminante electrofílico y el donador primario de electrones. En otras palabras, el potencial redox de las SH deberá ser más bajo o más negativo que el potencial del contaminante electrofílico e idealmente mayor y menos negativo que el donador primario de electrones (Van der Zee & Cervantes, 2009). La Tabla 1 muestra una lista breve sobre el uso de SH y quinonas actuando como MR durante la biotransformación de colorantes azo, nitrobencenos y compuestos halogenados.

Tabla 1. Biotransformación de contaminantes utilizando quinonas y sustancias húmicas como mediadores redox.

Contaminante[a]	Mediador redox[b]	Microorganismos	Resultados[c]	Referencias
Colorantes azo				
P-N5	AQDS	*Shewanella* cepa J18 143	4 ˣ.	Pearce *et al*. 2008
RR2	RF	*Methanothermobacter sp., Methanosarcina barkeri*	Cepas termofílicas: solo hubo reducción en la presencia de RF. Cepas mesofílicas: RF aceleró la reducción.	Dos Santos *et al*. 2006
NR14	RF	Lodo granular anaerobio	1.5 a 2 ˣ.	Cervantes *et al*. 2006
RO14, AD53, AD71	AQDS, LAW, RF	Lodo granular anaerobio	3.8 ˣ.	Encinas *et al*. 2006
NA52, NA7	AQS	*Issatchenkia occidentalis*	NA52: 3 ˣ. NA7: efecto adverso con el MR.	Ramalho *et al*. 2004

Nitrobencenos				
RDX	AQDS, AH	*Geobacter sp.*	La adición de AH y AQDS a los cultivos microbiológicos con Fe(III) incrementó de 5 a 66 ˣ	Kwon y Fonneran, 2006
TNT	AQDS	*Cellulomonas sp*., cepa ES6	3.7 ˣ.	Borch *et al*. 2005
RDX	AQDS	*Geobacter metallireducens*	Adición de AQDS incrementó la velocidad y grado de mineralización de RDX	Kwon y Finneran, 1998
Compuestos halogenados				
TCC	AQDS, RF, CNB12, HOB12	Lodo anaerobio	La tasa de reducción fue 3.8 ˣ, 4.0 ˣ, 13.3 ˣ y 13.6 ˣ con AQDS, RF, CNB12 y HOB12, respectivamente.	Guerrero-Barajas *et al*. 2005
TCC	AQDS, AH	Lodo anaerobio o *Geobacter sp.*	AQDS y AH estimularon la reducción de TCC por *Geobacter sp*., lo cual no ocurrió en ausencia de los MR	Cervantes *et al*. 2004
DDC	CAT, RES	Sedimento contaminado	4 a 6 ˣ.	Barkovskii y Adriaens, 1998
TCC	CNB12	*Shewanella alga,* cepa BrY	EE de 0% en ausencia de CNB12; EE de 92% con CNB12.	Workman *et al*. 1997

[a] NA52, Naranja Acido 52; NA7, Naranja Acido 7; P-N5, Pigmento Naranja 5; RR2, Rojo Reactivo 2; NR14, Naranja Reactivo 14; AD53, Azul Directo 53; AD71, Azul Directo 71; TNT, tri-nitro-tolueno; RDX, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina; TCC, tetracloruro de carbono; DDC, dibenzo-p-dioxinas cloradas.
[b] AQS, antraquinona-2-sulfonato; AQDS, antraquinone-2,6-disulfonato; RF, riboflavina; LAW, lawsona; AH, ácidos húmicos; CNB12, cianocobalamina; CAT, catecol; RES, resorcinol; HOB12, hidroxycobalamina.
[c] "x" indica el incremento en la velocidad de reducción (decoloración o deshalogenación, según sea el caso) en comparación al control sin mediador redox; EE, eficiencias de eliminación.

A pesar de que las quinonas y SH han sido extensamente estudiadas en procesos de (bio)transformación reductiva, su potencial para tratar contaminantes presentes en acuíferos y aguas residuales generadas por distintos sectores industriales no ha sido explotado. Existen importantes retos que impiden la aplicación de los MR a escala real, entre ellos, la solubilidad es una limitante por el hecho de que podrían ser fácilmente lavadas de los reactores. De esta forma, la inmovilización de MR representa una tarea

sumamente importante que debe realizarse antes de intentar aplicarlos a escala real. Además, se deberá considerar el uso de MR de bajo costo y efectivos, tal como las SH que pueden ser extraídas de ambientes naturales.

IMPACTO DE MEDIADORES REDOX INMOVILIZADOS

Existe evidencia contundente que indica que las SH y sus análogos quinonas pueden actuar como MR durante la transformación reductiva, química o microbiológica, de contaminantes electrofílicos (Van der Zee & Cervantes, 2009). Sin embargo, una de las principales limitaciones para aplicar los MR en sistemas de tratamiento de aguas residuales es su solubilidad, haciendo necesaria la adición continua de SH o quinonas para incrementar la velocidad de conversión, lo cual es económica y ambientalmente inviable. No obstante, los MR no necesariamente deben ser proveídos abundantemente en procesos de bioremediación para acelerar la transformación redox de los contaminantes, ya que estos pueden ser reciclados durante la transferencia de electrones desde el donador de electrones hasta el aceptor final de electrones, tal como se ilustra en la Fig. 2. Una forma posible de erradicar el requisito de la adición continua de MR a biorreactores anaerobios es mediante su inmovilización (Van der Zee & Cervantes, 2009). Actualmente hay importantes avances relacionados con la inmovilización y aplicación de MR (ver Tablas 2 y 3), sin embargo, ninguno de estos casos ha sido aplicado en un proceso a escala real.

Tabla 2. Impacto de mediadores redox inmovilizados en la (bio)transformación de contaminantes recalcitrantes. (Modificada de Martínez *et al*. 2013a)

Mediador redox[a]	Material inmovilizador	Mecanismo de inmovilización	Contaminante[b]	Resultados[c]	Referencias
Ácidos húmicos	Resina de intercambio iónico	Intercambio aniónico	RR2, fenol	ED de 90% y de oxidación de fenol de 75% utilizando MR inmovilizados; el reactor UASB fue operado por más de 200 días. El reactor sin MR colapsó en 120 días.	Martínez *et al*. 2013b
NQS, AQDS, ácidos	Resina de intercambio	Intercambio	RR2, TCC	La tasa de reducción	Cervantes *et*

húmicos,	iónico	aniónico		microbiológica fue mayor con NQS inmovilizada que suspendida. La tasa de decoloración fue mayor con ácidos húmicos inmovilizados que suspendidos.	*al*. 2013
Ácidos húmicos,	γ-Al_2O_3 (20-50 nm)	Adsorción	No aplica	La reducción microbiológica de ácidos húmicos inmovilizado ocurrió 3.7 veces más rápida que los suspendidos. Las nanopartículas cubiertas con ácidos húmicos promovieron una mejor actividad metanogénica en relación a las nanopartículas no modificadas.	Alvarez *et al*. 2012
Ácidos fúlvicos	γ-Al_2O_3 (63 µm)	Adsorción	CT	Se observó adsorción y reducción de TCC. 10.4 ^{x}, con EE 90%.	Alvarez *et al*. 2012
Ácidos húmicos	Resina de intercambio iónico	Intercambio aniónico	TCC, RR2	TCC: 4 ^{x}, con EE de ~74%. RR2: 2 ^{x}, con ED de ~69%.	Cervantes *et al*. 2011
AQDS, NQS	Resina de intercambio iónico	Intercambio aniónico	RR2, NM, RoM	Con AQDS se alcanzó 1.9 a 3.4 ^{x}. Con NQS fue de 3.5 a 8.8 ^{x}.	Cervantes *et al*. 2010
AQDS	$Al(OH)_3$ (15 nm)	Adsorción	RR2	7.5 ^{x}. ED de 43% después de 12 h.	Alvarez *et al*. 2010
AQS	Espuma de poliuretano	Covalente	Amaranto	5 ^{x}, con una ED de 98.7% después de 10 ciclos.	Lu *et al*. 2010

ATD, RD, VD, AD	Fibras de terileno y algodón	Químico	10 colorantes azo	1.5 a 3 [x] en todos los colorantes.	Guo *et al*. 2010a
Antraquinona	Alginato de calcio	Encapsulamiento	Nitrato	2 [x] en la tasa desnitrificante.	Guo *et al*. 2010b
AQDS	Alginato de calcio	Encapsulamiento	RA3R	ED de ~100% y 34% con y sin AQDS respectivamente.	Su *et al*. 2009
AQDS	Polipirrol	Dopaje en pirrol	11 colorantes azo	1 a 3 [x]. ED entre 65-92%.	Wang *et al*. 2009
AQDS	Polipirrol	Dopaje en pirrol	RR120	3.2 [x]. ED de 80% después de 6 ciclos.	Li *et al*. 2009
AQDS	Polipirrol	Dopaje en pirrol	NB, DNT	4.8 a 5.7 [x]. EE >90% después de 6 ciclos para 2,4-DNT.	Li *et al*. 2008
Antraquinona	Alginato de calcio	Encapsulamiento	AB, RBR, EA, RAB, RAG, RRBK	1.5 a 2 [x]. Buena reusabilidad después de 4 ciclos.	Guo *et al*. 2007

[a] ATD, Azul Turquesa Disperso S-GL; RD, Rojo Disperso S-GL3B; VD, Violeta Disperso S-GLHFRL; AD, Azul Disperso S-GL2BLN; AQS, antraquinona-2-sulfonato; AQDS, antraquinona-2,6-disulfonato; NQS, 1,2-Naftoquinona-4-sulfonato.
[b] NA, Negro Acido 10B; RBR, Rojo Brillante Reactivo X-3B; EA, Escarlata Acido GR; RAB, Rojo Acido B; RAG, Rojo Acido G; RRBK, Rojo Reactivo Brillante K-2BP; NB, Nitrobenceno; DNT, 2,4- and 2,6-dinitrotolueno; RR2, Rojo Reactivo 2; NM, Naranja de Metilo; RoM, Rojo de Metilo; RR120, Rojo Reactivo 120; RA3R, Rojo Acido 3R; TCC, tetracloruro de carbono.
[c] "x" indica el incremento en la velocidad de reducción (decoloración o deshalogenación, según sea el caso) en comparación al control sin mediador redox; ED, eficiencia de decoloración; EE, eficiencia de eliminación; CF, cloroformo.

Tabla 3. Impacto de materiales carbonáceos en la (bio)transformación de contaminantes prioritarios.

Material carbonáceo	**Condiciones oxidantes[a]**	**Contaminantes[b]**	**Resultados[c]**	**Referencias**
Fibras de carbón	HNO_3	RM	La tasa de decoloración fue 1.8 veces más rápida con las fibras modificadas (expuestas por 2 h a HNO_3) en relación al material no	Ríos Del Toro *et al*. 2013

			modificado.	
Fibras de carbón	HNO_3	4-NF, 3-CNB	Mayor (1.68 veces) concentración grupos quinona en la superficie del material, lo que incrementó su capacidad catalítica hasta 1.38 veces.	Amezquita *et al*. 2013
Grafito	NM	NG, RDX	EE ≥90% para NG y RDX con grafito y sulfuro.	Xu *et al*. 2010
Carbón activado	Con HNO_3 y O_2. Térmica con H_2 y N_2	RR2, NA7, AM10, AD71	Reducción química: 9 [x], usando sulfuro y 0.1 g CA/L. Reducción biológica: de 2 a 4.5 [x] con CA modificado con H_2.	Pereira *et al*. 2010
Carbón activado	HNO_3, tratamiento térmico	NII, NR5	ED >88% en los dos colorantes, utilizando el CA con la mayor área específica.	Mezohegyi *et al*. 2010
Grafito	NM	DNT, RDX	DNT: EE de ~95% y ~16%; RDX: EE de 94% y 26%, en ambos casos con y sin grafito respectivamente.	Oh *et al*. 2009
Carbón activado	NM	TT, NG, RA, AO	Altas velocidades de reducción, con ≥80% de ED en ~2 min.	Mezohegyi *et al*. 2009
Grafito Carbón activado	NM	RDX	EE cercana al 100% después de 2 h. La velocidad de reducción se vio favorecida por el incremento de sulfuro, pH y CA.	Kemper *et al*. 2008
Carbón activado	NM	NA7	ED de 99% en 2 min.	Mezohegyi *et al.* 2007
Carbón activado	NM	RR2, NA7	ED de ~35%, ~45% y ~95% con 0, 0.4 y 10 g CA/L, respectivamente.	Van der Zee *et al*. 2003
Grafito	NM	DNT	EE de 93.5%.	Oh *et al*. 2002

[a] NM, material carbonáceo no modificado.

[b] RR2, Reactive Red 2; NA7, Naranja Acido 7; AM10, Amarillo Mordiente 10; AD71, Azul Directo 71; RM, Rojo de Metilo; 4-NF, 4-nitrofenol; 3CNB, 3-cloronitrobenceno; NII, Naranja II; NR5, Negro Reactivo 5; TT, Tartrazina; NG, Naranja G; AO, Amarillo Ocaso FCF; RA, Rojo Acido 88; DNT, 2,4-dinitrotolueno; RDX, hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina; NG, nitroglicerina

[c] "x" indica el incremento en la velocidad de reducción (decoloración o deshalogenación, según sea el caso) en comparación al control sin mediador redox; CA, carbón activado; ED, eficiencia de decoloración; EE, eficiencia de eliminación.

Inmovilización de quinonas modelo

La mayoría de los estudios enfocados en elucidar el papel de MR inmovilizados en procesos de biotransformación de contaminantes han sido desarrollados con quinonas modelo. La antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS), ilustrada en la Figura 1, es el MR más comúnmente utilizado tanto en forma inmovilizada (Tabla 2) como soluble (Van der Zee & Cervantes, 2009). La Tabla 2 presenta un listado de los estudios que reportan el uso de diferentes materiales para inmovilizar quinonas modelo. De acuerdo a los materiales utilizados, se han reportado distintos mecanismos de inmovilización como adsorción, encapsulamiento, enlace covalente y dopaje (Tabla 2). Además, la mayoría de estos estudios fueron enfocados en la biotransformación de colorantes azo.

El alginato de calcio ha sido utilizado para la inmovilización de MR a través de la encapsulación de antraquinonas (Guo *et al.,* 2010a, 2010b; Su et al., 2009; Guo *et al.,* 2007). Para esto, una suspensión de antraquinona fue mezclada con alginato de sodio en una relación de 0.05%, y después fue mezclado con una solución de $CaCl_2$, para luego formar partículas de 3-4 mm de diámetro. Guo *et al.,* (2007) probaron el efecto catalítico de las quinonas inmovilizadas en alginato de calcio durante la reducción microbiológica de diferentes colorantes azo, alcanzando un incremento en la velocidad de decoloración de hasta 1.5 a 2 veces comparado con el control sin MR. De igual forma, la eficiencia de decoloración fue del ~100% y 34%, para los tratamientos con quinona (inmovilizada) y sin quinona, respectivamente; utilizando Rojo Acido 3R y lodo anaerobio (Su *et al.,* 2009). Un proceso desnitrificante también fue estudiado mediante el uso alginato de calcio modificado con quinonas; alcanzándose una tasa desnitrificante 2 veces mayor respecto al control sin quinonas (Guo *et al.,* 2010b). Algunas desventajas del alginato de calcio pueden ser: 1) limitación en la transferencia de masa, pues las quinonas se encuentran dentro del material, lo que hace difícil su accesibilidad; 2) pérdida gradual de la capacidad redox debido al rompimiento del material polimérico, resultado de su baja resistencia mecánica.

Los compositos de polipirrol también fueron modificados con AQDS a través de la electropolimerización de monómeros de pirrol sobre un electrodo de fieltro de carbón activado. Este composito fue utilizado como catalizador para la reducción de compuestos nitroaromáticos (Li *et al.,* 2008) y colorantes azo (Li *et al.,* 2009; Wang *et al.,* 2009). La velocidad de biotransformación de los compuestos nitroaromáticos fue incrementada 5.1, 5.7 y 4.8 veces más para el nitrobenceno, 2,4- y 2,6-dinitrotolueno, respectivamente, en relación al control sin AQDS (Li *et al.,* 2008). Por otro lado, el composito incrementó entre 1 y 3.2 veces la velocidad de decoloración respecto al control sin MR, con eficiencias de decoloración ≥65% para doce compuestos azo estudiados (Li *et al.,* 2009; Wang *et al.,* 2009). Este

mecanismo de inmovilización parece ser más atractivo para las aplicaciones a escala real que el método utilizado mediante el alginato de calcio.

Otro método desarrollado para inmovilizar MR es mediante la adsorción de AQDS y 1,2-naftoquinona-4-sulfonato sobre resinas de intercambio aniónico, el cual fue propuesto por Cervantes *et al.,* (2010). La capacidades máximas de adsorción fueron 1.42 mmol de naftoquinona/g y 1.87 mmol AQDS/g; estos valores fueron similares a los diferentes pH (6, 7, 8) utilizados. En este estudio se utilizaron tres colorantes azo con el fin de evaluar la capacidad catalítica del MR inmovilizado. Comparado con el control en donde no se suministraron MR, hubo un incremento en la velocidad de decoloración de hasta 8.8 veces para Naranja de Metilo utilizando la naftoquinona inmovilizada. La adsorción de los MR fue estable a 25 °C, sin embargo, en altas condiciones de temperatura y una alta concentración de aniones (fosfato y sulfato) puede existir competencia por los sitios de adsorción entre los aniones y quinonas (Cervantes *et al.,* 2010). Alvarez *et al.,* (2010) reportaron la inmovilización de AQDS en nanopartículas de óxidos metálicos y su aplicación en procesos de decoloración utilizando un consorcio anaerobio. Entre todos los materiales probados, las nanopartículas de $Al(OH)_3$ fueron las más apropiadas para la inmovilización de AQDS. Ciertamente, la capacidad de adsorción fue 0.105 mmol AQDS/g, lo que representa una capacidad de hasta 67 veces más alta respecto al resto de las nanopartículas utilizadas. La AQDS inmovilizada en $Al(OH)_3$ fue utilizada como MR, incrementando la velocidad de decoloración hasta 7.52 veces respecto al control sin quinonas (Alvarez *et al.,* 2010).

Inmovilización de sustancias húmicas

El uso de SH inmovilizadas en la biotransformación anaerobia de contaminantes recalcitrantes no ha sido tan ampliamente estudiado como las quinonas modelo. El primer reporte fue publicado por Cervantes *et al.,* (2011), y muestra la inmovilización de SH sobre resinas de intercambio aniónico y su aplicación en la reducción de tetracloruro de carbono y Rojo Reactivo 2. En este estudio las SH húmicas fueron previamente modificadas mediante la introducción de grupos sulfónico, utilizando ácido clorosulfónico ($HClSO_3$), de acuerdo al método reportado por Yudov *et al.,* (2005). La sulfonación incrementó hasta 10.5 y 5.5 veces la solubilidad de las SH a pH 7 y 10 respectivamente, en comparación con la muestra no modificada. La capacidad de adsorción de las SH sulfonadas en las resinas fue 2 veces mayor que las SH no sulfonadas. Además, las resinas modificadas con SH incrementaron hasta 4 y 2 veces el grado de reducción de tetracloruro de carbono y Rojo Reactivo 2, respectivamente, utilizando un consorcio anaerobio (Cervantes *et al.,* 2011). En un estudio posterior se demostró que el paso limitante del proceso fue la reducción microbiológica de las SH

inmovilizadas y suspendidas, el cual fue evidenciado por una velocidad de hasta tres órdenes de magnitud mayor en la transferencia de electrones de las SH hacia el Rojo Reactivo 2 (Cervantes *et al.,* 2013). Las resinas modificadas con SH también fueron utilizadas durante la eliminación simultánea de dos contaminantes recalcitrantes, fenol y Rojo Reactivo 2, utilizando un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB, Martínez *et al*., 2013b). Este estudio representa el primer reporte sobre la aplicación del concepto de SH inmovilizadas en un reactor en continuo, el cual fue operado durante aproximadamente 200 días. El reactor UASB empacado con resinas modificadas alcanzó eficiencias de decoloración de 90%, y de oxidación de fenol de 75%. Por su parte, el reactor control con resinas no modificadas con SH perdió gradualmente su capacidad de operación, colapsando después de 120 días de la adición del colorante Rojo Reactivo 2 (Martínez *et al*., 2013b). Por otro lado, Alvarez *et al.,* (2012) documentaron el uso de ácidos fúlvicos inmovilizados en alúmina durante la reducción de tetracloruro de carbono. Los ácidos fúlvicos fueron extraídos del suelo de un bosque templado de San Luis Potosí, México, y posteriormente fueron inmovilizados en partículas de alúmina de 45-63 µm. Los ácidos fúlvicos inmovilizados mostraron buena capacidad catalítica durante la deshalogenación de tetracloruro de carbono, con una tasa de reducción de hasta 10.4 veces mayor respecto al control sin MR. La Figura 3 muestra las reacciones redox que se llevan a cabo durante la biotransformación reductiva de contaminantes electrofílicos en presencia de micropartículas de alúmina, las cuales actúan como material de soporte de SH y como núcleo para la formación de una biopelícula.

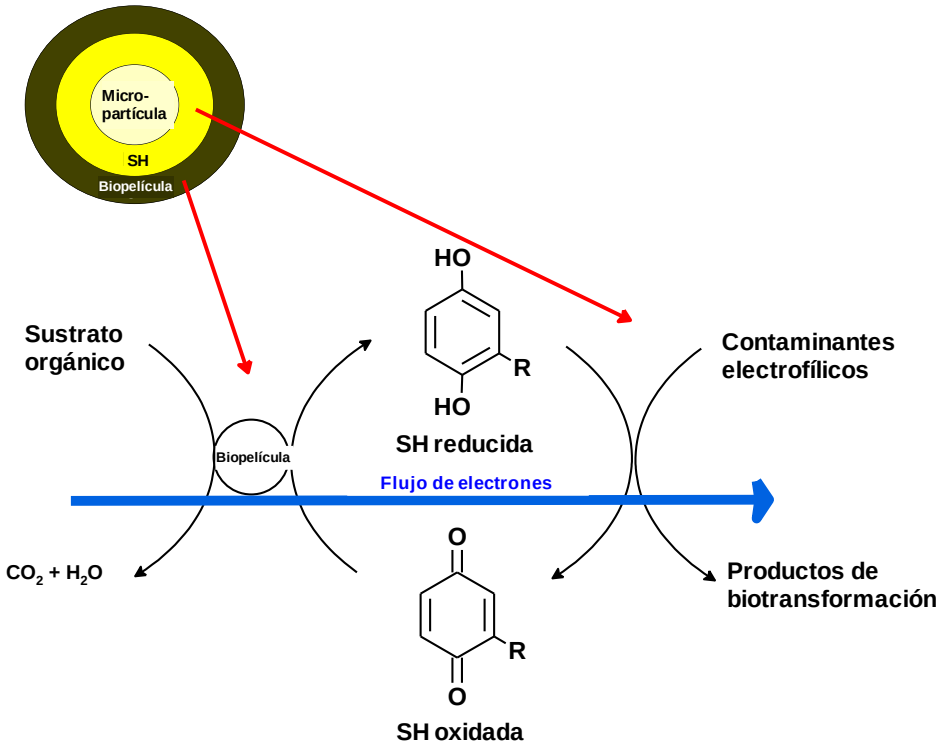


Fig. 3. Micropartículas de óxidos metálicos cubiertas con SH que sirven como núcleo para la formación de una biopelícula durante la biotransformación de contaminantes electrofílicos. Modificado de Cervantes *et al*., 2013.

Las SH pueden ser inmovilizadas en distintos materiales a través de métodos físicos y químicos. Sin embargo, muchos de estos materiales modificados con SH aún no han sido utilizados en reacciones redox, pero parecen cumplir los requerimientos para servir como MR en fase sólida para la biotransformación reductiva de contaminantes. Por ejemplo, Perminova *et al*. (2007) desarrollaron un procedimiento para inmovilizar covalentemente SH sobre gel de sílice vía alcoxilación. Además, Klavins & Apsite (1997) propusieron un método para la inmovilización covalente de ácidos fúlvicos y ácidos húmicos sobre varios polímeros como estireno-divinilbenceno, celulosa y sílice.

El uso de nanopartículas para adsorber MR tal como lo muestra Alvarez *et al.,* (2010), presenta la desventaja de un posible lavado del material de los biorreactores anaerobios. Sin embargo, el proceso de granulación anaerobia representa una oportunidad para la co-inmovilización de microorganismos reductores del humus y nanopartículas cubiertas con SH, a fin de prevenir la perdida de este MR en fase sólida

(Alvarez & Cervantes, 2011). De hecho, ha sido demostrado que el proceso de granulación anaerobia puede llevarse a cabo utilizando nanopartículas de alúmina cubiertas con SH (resultados no publicados). En estudios previos se demostró que las nanopartículas modificadas con SH redujeron su efecto inhibitorio sobre la metanogénesis en comparación a las nanopartículas no modificadas. Además, también se demostró que la reducción microbiológica de SH inmovilizadas en nanopartículas de alúmina fue hasta 3.7 veces más rápida en comparación a los ensayos con SH suspendidas (Alvarez & Cervantes, 2012). Estos hallazgos representaron las bases para llevar a cabo el proceso de granulación con SH inmovilizadas en nanopartículas de alúmina. La Figura 4 muestra el modelo de granulación anaerobia utilizando nanopartículas cubiertas con SH, y microorganismos reductores del humus, el cual se basa en la teoría del espagueti propuesta por Wiegant (1987). El modelo indica el uso de cationes divalentes como calcio (Ca^{2+}) para promover una mejor atracción electrostática entre las SH y los microorganismos. Tanto las nanopartículas cubiertas con SH como la membrana celular de los microorganismos están negativamente cargadas a pH neutro, por lo que los iones Ca^{2+} ayudan a disminuir las fuerzas de repulsión entre las SH y los microorganismos.

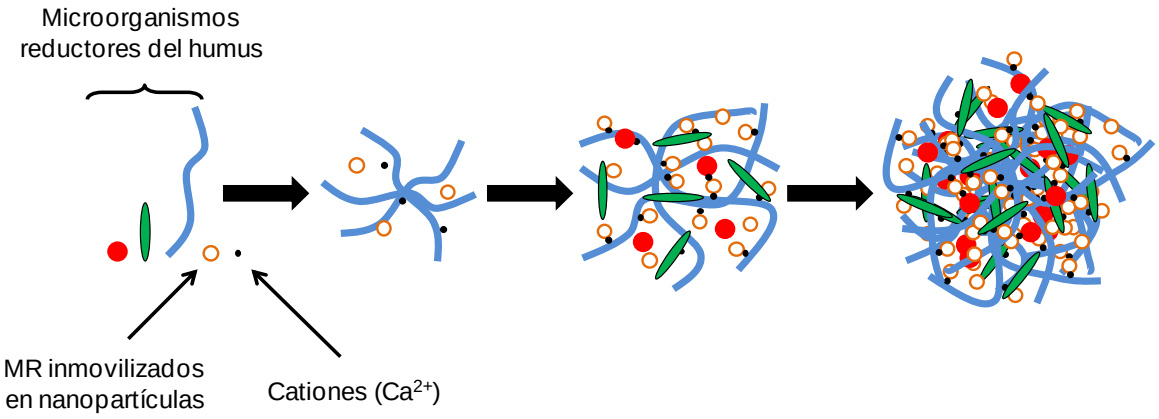


Fig. 4. Modelo propuesto para co-inmovilización de microorganismos reductores del humus y nanopartículas cubiertas con sustancias húmicas (Alvarez *et al*., 2012).

Uso de materiales carbonáceos como MR

Algunos materiales carbonáceos (MC) como el carbón activado y grafito han sido utilizados como MR durante la reducción química y biológica de contaminantes recalcitrantes (Tabla 3). A diferencia de los

procesos previamente descritos para inmovilizar SH y quinonas modelo, el uso de MC puede no requerir MR adicionales, ya que contienen diferentes grupos funcionales en su superficie, incluyendo quinonas (Figueiredo *et al.,* 1999). Sin embargo, los MC también pueden ser modificados químicamente mediante la introducción de distintos grupos oxigenados a fin de incrementar sus propiedades catalíticas.

La modificación química de la superficie de los MC puede promover una mayor capacidad redox, lo cual puede mejorar la reducción de diferentes contaminantes aceptores de electrones. Por ejemplo, Pereira *et al.,* (2010) encontraron un mayor grado de decoloración utilizando carbón granular activado modificado térmicamente (en presencia de H_2), en relación a otros métodos de oxidación probados. La velocidad de decoloración del compuesto Amarillo Mordiente 10 fue 8.6 veces mayor en presencia del carbón granular modificado térmicamente en relación al carbón no modificado. Otros MC que fueron modificados químicamente son las fibras de carbón. Este material fue sometido a oxidación con HNO_3 8 M, para su posterior aplicación como MR durante la reducción microbiológica de Rojo de Metilo (Ríos Del Toro *et al.,* 2013) y reducción química de 4-nitrofenol y 3-cloronitrobenceno (Amezquita *et al*., 2013). En el primer caso, la decoloración de Rojo de Metilo ocurrió hasta 1.8 veces más rápida en presencia de las fibras modificadas (expuestas durante 2 h a HNO_3) en comparación a las no modificadas. Además, se observó que la formación de una biopelícula sobre las fibras de carbón activado redujeron la velocidad de decoloración hasta 6.7 veces, indicando que las biomasa adherida al MC limita la transferencia de masa. Por su parte, Amezquita *et al.,* (2013) produjeron fibras de carbón con un incremento de hasta 1.68 veces de concentración de grupos quinonas en su superficie, lo cual también incremento su capacidad catalítica hasta 1.38 veces.

Existen MC que no fueron modificados químicamente pero que demostraron buena actividad catalítica durante la reducción de compuestos nitroaromáticos (Tabla 3). Uno de estos materiales es el grafito, que fue utilizado para reducir químicamente el 2,4-dinitrotolueno, hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina, bajo distintas condiciones de pH, concentración del agente reductor de los MC, y concentración de grafito (Xu *et al.,* 2010; Oh & Chiu, 2009; Kemper *et al.,* 2008; Oh *et al.,* 2002).

FUENTES APROPIADAS DE SUSTANCIA HUMICAS

Entre las diferentes moléculas con sitios redox activos reportados en la literatura, como citocromos (Picardal *et al.,* 1993), flavinas/cobalaminas (Guerrero-Barajas *et al.,* 2005), piridinas (Lee *et al.,* 1999), fenazinas (Hernández *et al.,* 2004) y porfirinas (Koons *et al.,* 2001), las quinonas son reconocidas como los MR más apropiados para la biotransformación

reductiva de muchos contaminantes (Field *et al.,* 1995). Diferentes quinonas sintéticas, como la AQDS, han sido utilizadas como MR modelo en procesos reductivos; sin embargo, las quinonas se encuentran presentes en las SH, que son compuestos producidos de manera natural y abundante en la biosfera. Las SH son la fuente más abundante y barata de materia orgánica presente en sistemas terrestres y acuáticos; además, su largo tiempo de residencia (>250 años; Stevenson, 1994) puede permitir su aplicación en procesos de bioremediación, aunado a que se considera un material no peligroso y que no libera subproductos tóxicos (Perminova *et al.,* 2005).

En un estudio de caracterización de SH descrito por Hernández *et al.,* (2012) se encontraron valores de capacidad de transferencia de electrones entre 112 y 392 µmol/g, lo cual dependió del origen del material crudo. Otros estudios indican que las SH originadas a partir de turba, sedimentos de rio o suelos mostraron una capacidad entre 25 y 538 µmol/g (Ratasuk & Nanny, 2007). De esta forma, a fin de tomar ventaja durante la selección de MR apropiados para propósitos biodegradación se deberán considerar las distintas fuentes de MR presentes en la naturaleza, sobre todo aquellas con alta capacidad para transferir electrones. Ciertamente la variabilidad intrínseca en las propiedades redox de las SH es el principal factor que limita su aplicación en tecnologías de remediación. Sin embargo, las SH pueden ser modificadas mediante la incorporación de grupos quinona a fin de mejorar sus propiedades redox, lo cual puede ser requerido durante la biotransformación de un gran número de contaminantes. La modificación de las SH con quinonas puede llevarse a cabo siguiendo dos diferentes estrategias. La primera estrategia considera la oxidación de los fragmentos fenólicos asociados a la estructura aromática del humus. La segunda estrategia es la policondensación de los fragmentos fenólicos, que se puede obtener con hidroquinonas y catecol. Con estos dos métodos la capacidad de transferencia de electrones puede alcanzar entre 1 a 4 mmol/g, que son valores sumamente grandes en relación a las muestras de humus no modificadas (Perminova *et al.,* 2005). Las SH químicamente modificadas con estos métodos nunca han sido utilizadas como MR en procesos de biotransformación de contaminantes recalcitrantes, pero parecen ser muy apropiadas para tal fin. De esta forma, el gran potencial que tienen las SH de actuar como MR puede ser mejorado, a fin de aplicarse y mejorar los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

PERSPECTIVAS EN LA APLICACIÓN DE MEDIADORES REDOX

A pesar de que las quinonas y SH han sido extensamente utilizadas como MR en procesos de (bio)transformación reductiva, su potencial para tratar contaminantes prioritarios presentes en acuíferos y aguas residuales generadas por diversos sectores

industriales no ha sido explotado. Ciertamente, los diferentes métodos de inmovilización descritos en este trabajo pueden permitir, en el futuro cercano, la aplicación de MR para mejorar los sistemas de tratamiento de aguas residuales que contengan contaminantes susceptibles reducirse. Sin embargo, también es necesario considerar otros aspectos que permitan la aplicación apropiada de los MR, tales como 1) fuentes de SH con bajo costo y efectivas; 2) ingeniería de SH; 3) limitaciones catalíticas en los MR (Van der Zee & Cervantes, 2009). Sobre la inmovilización de MR se deberá trabajar en los siguientes puntos:

- La fuerza de inmovilización de MR es importante por el hecho de que mejores mecanismos de inmovilización pueden permitir mantener la capacidad redox por largos periodos de tiempo, reduciendo así los costos de operación. En este sentido, la inmovilización covalente representa la opción más adecuada, sin embargo, otras técnica pueden ser también consideradas (por ejemplo, la atracción electrostática).
- Evaluar la capacidad catalítica de los MR inmovilizados durante periodos largos, y no sólo en pruebas en lote. Esto tiene relación con el punto anterior. La utilización de reactores en continuo permitirá identificar si los MR inmovilizados mantienen su capacidad catalítica, especialmente con el uso de aguas residuales no sintéticas.
- Elucidar los impactos de la formación de una biopelícula en la superficie de los materiales adsorbentes de MR; tanto en la transferencia de electrones desde el donador de electrones (sustrato) para reducir las SH (reacción microbiológica), como en la transferencia de electrones desde las SH hacia los contaminantes (reacción química).
- Las gran diversidad de contaminantes (colorantes azo, compuestos nitroaromáticos y halogenados) utilizados en la industria hacen necesario probar los MR inmovilizados bajo una mezcla de contaminantes o con muestras reales de agua residual.

AGRADECIMIENTOS

Luis H. Alvarez agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca (#167847) posdoctoral otorgada y por el financiamiento otorgado a través del proyecto SEP-CONACYT #155656. De igual forma se agradece a la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería por otorgar la distinción del Premio Alfredo Sánchez Marroquín 2013 a la mejor tesis doctoral.

REFERENCIAS

Alvarez LH & Cervantes FJ (2011) (Bio)Nanotechnologies to enhance environmental quality and energy production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86: 1354-1363.

Alvarez LH & Cervantes FJ (2012) Assessing the impact of alumina nanoparticles in an anaerobic consortium: methanogenic and humus reducing activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95: 1323-1331.

Alvarez LH, Jimenez L, Hernandez-Montoya V & Cervantes FJ (2012) Enhanced dechlorination of carbon tetrachloride by immobilized fulvic acids on alumina particles. *Water Air and Soil Poll.* 223: 1911-1920.

Alvarez LH, Perez-Cruz MA, Rangel-Mendez JR & Cervantes FJ (2010) Immobilized redox mediator on metal-oxides nanoparticles and its catalytic effect in a reductive decolorization process. *J. Hazard. Mater.* 184:268–272.

Amezquita-Garcia HJ, Razo-Flores E, Cervantes FJ & Rangel-Mendez JR (2013) Activated carbon fibers as redox mediators for the increased reduction of nitroaromatics. *Carbon* 55: 276–284.

Barkovskii AL & Adriaens P (1998) Impact of humic constituents on microbial dechlorination of polychlorinated dioxins. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 1013–1020.

Borch T, Inskeep WP, Harwood JA & Gerlach R (2005) Impact of ferrihydrite and anthraquinone- 2,6-disulfonate on the reductive transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by a Grampositive fermenting bacterium. *Environ. Sci. Technol.* 39: 7126–33.

Cervantes FJ, Enriquez JE, Mendoza-Hernandez MR, Razo-Flores E & Field JA (2006) The role of sulphate reduction on the reductive decolorization of the azo dye reactive orange 14. *Water Sci. Technol.* 54: 171–177.

Cervantes FJ, Vu-Thi-Thu L, Lettinga G & Field JA (2004) Quinone-respiration improves dechlorination of carbon tetrachloride by anaerobic sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 702–11.

Cervantes FJ, González-Estrella J, Márquez A, Alvarez LH & Arriaga S (2011) Immobilized humic substances on an anion exchange resin and their role on the redox biotransformation of contaminants. *Bioresour. Technol.* 102: 2097-2100.

Cervantes FJ, Garcia-Espinosa A, Moreno-Reynosa MA & Rangel-Mendez JJ (2010) Immobilized redox mediators on anion exchange resins and their role on the reductive decolorization of azo dyes. *Environ. Sci. Technol.* 44: 1747-1753.

Cervantes FJ, Martínez CM, Gonzalez-Estrella J, Marquez A & Arriaga S (2013) Kinetics during the redox biotransformation of pollutants mediated by immobilized and soluble humic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 2671–2679.

Dos Santos AB, De Madrid MP, De Bok FAM, Stams AJM, Van Lier JB & Cervantes FJ

(2006) The contribution of fermentative bacteria andmethanogenic archaea to azo dye reduction by a thermophilic anaerobic consortium. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 38–46.

Field JA, Cervantes FJ, van der Zee FP & Lettinga G (2000) Role of quinones in the biodegradation of priority pollutants: a review. *Wat. Sci. Technol.* 42: 215-222.

Field JA, Stams AJM, Kato M & Schraa G (1995) Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 67: 47–77.

Figueiredo JL, Pereira MFR, Freitas MMA & Órfão JMM (1999) Modification of the surface chemistry of activated carbons. *Carbon* 37: 1379-1389.

Guerrero-Barajas C & Field JA (2005) Riboflavin- and cobalamin-mediated biodegradation of chloroform in a methanogenic consortium. *Biotechnol. Bioeng.* 89: 539–550.

Guo J, Kang L, Lian J, Yang J, Yan B, Li Z, Liu C & Yue L (2010a) The accelerating effect and mechanism of a newly functional bio-carrier modified by redox mediators for the azo dyes decolorization. *Biodegradation* 21: 1049-1056.

Guo J, Kang L, Yang J, Wang X, Lian J, Li H, Guo Y & Wang Y (2010b) Study on a novel non-dissolved redox mediator catalyzing biological denitrification (RMBDN) technology. *Bioresour. Technol.* 101: 4238-4241.

Guo J, Zhou J, Wang D, Tian C, Wang P, Salah Uddin M & Yu H (2007) Biocatalyst effects of immobilized anthraquinone on the anaerobic reduction of azo dyes by the salt-tolerant bacteria. *Water Res.* 41: 426-432.

Hernandez ME, Kappler A & Newman DK (2004) Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 921–928.

Hernández V, Alvarez LH, Montes-Moran MA & Cervantes FJ (2012) Reduction of quinone and non-quinone redox functional groups in different humic acid samples by *Geobacter sulfurreducens*. *Geoderma* 183-184: 25-31.

Kemper JM, Ammar E & Mitch WA (2008) Abiotic degradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine in the presence of hydrogen sulfide and black carbon. *Environ. Sci. Technol.* 42:2118-2123.

Klavins M & Aspite E (1997) Immobilization of humic substances, in: Drozd J, Gonet SS, Senesi N, Weber J Eds. The role of humic substances in the ecosystems and in environmental protection. PTSH-Polish Society of Humic Subtances, Wroclaw, Poland.

Koons BW, Baeseman JL & Novak PJ (2001) Investigation of cell exudates active in carbon tetrachloride and chloroform degradation. *Biotechnol. Bioeng.* 74: 12–17.

Kwon M & Finneran K (1998) Biotransformation products and

mineralization potential for hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) in abiotic versus biological degradation pathways with anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS) and *Geobacter metallireducens*. *Biodegradation* 19: 705–715.

Kwon MJ & Finneran KT (2006) Microbially mediated biodegradation of hexahydro-1,3,5- trinitro-1,3,5- triazine by extracellular electron shuttling compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5933–5941.

Lee CH, Lewis TA, Paszczynski A & Crawford RL (1999) Identification of an extracellular catalyst of carbon tetrachloride dehalogenation from *Pseudomonas stutzeri* strain KC as pyridine-2,6-bis(thiocarboxylate). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261: 562–566.

Li L, Wang J, Zhou J, Yang F, Jin C, Qu Y, Li A & Zhang L (2008) Enhancement of nitroaromatic compounds anaerobic biotransformation using a novel immobilized redox mediator prepared by electropolymerization. *Bioresour. Technol.* 99: 6908-6916.

Li L, Zhou J, Wang J, Yang F, Jin C & Zhang G (2009) Anaerobic biotransformation of azo dye using polypyrrole/anthraquinonedisulphonate modified active carbon felt as a novel immobilized redox mediator. *Sep. Purif. Technol.* 66: 375-382.

Lu H, Zhou J, Wang J, Si W, Teng H & Liu G (2010) Enhanced biodecolorization of azo dyes by anthraquinone-2-sulfonate immobilized covalently in polyurethane foam. *Bioresour. Technol.* 101: 7185–7188.

Martínez CM, Alvarez LH, Celis LB & Cervantes FJ (2013a) Humus-reducing microorganisms and their valuable contribution in environmental processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 97: 10293-10308.

Martínez CM, Celis LB & Cervantes FJ (2013b) Immobilized humic substances as redox mediator for the simultaneous removal of phenol and Reactive Red 2 in a UASB reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 97: 9897-9905.

Mezohegyi G, Goncalves F, Órfão JJM, Fabregat A, Fortuny A, Font J, Bengoa C & Stuber F (2010) Tailored activated carbons as catalysts in biodegradation of textile azo dyes. *Appl. Catal. B: Environ.* 94: 179–185.

Mezohegyi G, Fabregat A, Font J, Bengoa C, Stuber F & Fortuny A (2009) Advanced bioreduction of commercially important azo dyes: modeling and correlation with electrochemical characteristics. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48: 7054-7059.

Mezohegyi G, Kolodkin A, Castro UI, Bengoa C, Stuber F, Font J & Fabregat A (2007) Effective anaerobic decolorization of azo dye Acid Orange 7 in continuous upflow packed bed reactor using biological activated carbon system. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46: 6788–6792.

Oh SY, Cha DK & Chiu PC (2002) Graphite-mediated reduction of 2,4-dinitrotoluene with elemental iron. *Environ. Sci. Technol.* 36: 2178-2184.

Oh SY & Chiu PC (2009) Graphite- and soot-mediated reduction of 2,4-dinitrotoluene and hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine. *Environ. Sci. Technol.* 43: 6983-6988.

Pearce CI, Guthrie JT & Lloyd JR (2008) Reduction of pigment dispersions by *Shewanella* strain J18 143. *Dyes Pigm.* 76: 696–705.

Pereira L, Pereira, R, Pereira MFR, van der Zee FP, Cervantes FJ & Alves MM (2010) Thermal modification of activated carbon surface chemistry improves its capacity as redox mediator for azo dye reduction. *J. Hazard. Mater.* 183:931-939.

Perminova I, KarpioukL, Shcherbina N, Ponomarenko S, Kalmykov S & Hatfield K (2007) Preparation and use of humic coatings covalently bound to silica gel for Np(V) and Pu(V) sequestration. J. Alloy. Compd. 444-445: 512-517.

Perminova IV, Kovalenko AN, Schmitt-Kopplin P, Hatfield K, Hertkorn N, Belyaeva EY & Petrosyan VS (2005) Design of quinonoid-enriched humic materials with enhanced redox properties. *Environ. Sci. Technol.* 39: 8518–8524.

Picardal FW, Arnold RG, Couch H, Little AM & Smith ME (1993) Involvement of cytochromes in the anaerobic biotransformation of tetrachloromethane by *Shewanella putrefaciens* 200. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3763–3770.

Ramalho PA, CardosoMH, Cavaco-Paulo A & Ramalho MT (2004) Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2279–2288.

Ratasuk N & Nanny MA (2007) Characterization and quantification of reversible redox sites in humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 41: 7844–7850.

Rios-Del Toro E, Celis LB, Cervantes FJ & Rangel-Mendez JR (2013) Enhanced microbial decolorization of methyl red with oxidized carbon fiber as redox mediator. *J. Hazard Mater.* 260: 967–974.

Stevenson FJ (1994) Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Su Y, Zhang Y, Wang J, Zhou J, Lu X & Lu H (2009) Enhanced bio-decolorization of azo dyes by co-immobilized quinone-reducing consortium and anthraquinone. *Bioresour. Technol.* 100: 2982-2987.

Van der Zee FP, Bisschops IA, Lettinga G & Field JA (2003) Activated carbon as an electron acceptor and redox mediator during the anaerobic biotransformation of azo dyes. *Environ. Sci. Technol.* 37: 402-408.

Van der Zee FP & Cervantes FJ (2009) Impact and application of electron shuttles on the redox (bio)transformation of contaminants: A review. *Biotechnol. Adv.* 27: 256–277.

Wang J, Li L, Zhou J, Lu H, Liu G, Jin R & Yang F (2009) Enhanced

biodecolorization of azo dyes by electropolymerization-immobilized redox mediator. *J. Hazard. Mater.* 168: 1098-1104.

Wiegant WM (1987) The spaghetti theory on anaerobic sludge formation, or the inevitability of granulation, in *Granular anaerobic sludge: Microbiology and technology*, ed by Lettinga G, Zehnder AJB, Grotenhuis JTC & Hulshoff Pol LW. The Netherlands: Pudoc. Wageningen.

Workman DJ, Woods SL, Gorby YA, Fredrickson JK & Truex MJ (1997) Microbial reduction of vitamin B12 by *Shewanella alga* strain BrY with subsequent transformation of carbon tetrachloride. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2292–2297.

Xu W, Dana KE & Mitch WA (2010) Black carbon-mediated destruction of nitroglycerin and RDX by hydrogen sulfide. *Environ. Sci. Technol.* 44: 6409-6415.

Yudov MV, Zhilin DM, Pankova AP, Rusanov AG, Perminova IV, Petrosyan VS & Matorin DN (2005) Synthesis, metal-binding properties and detoxifying ability of sulphonated humic acids, in: Perminova IV, Hatfield K & Hertkorn N Eds. Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 485-498.

Efecto de la Clonación del Gen *zwf* sobre la Producción de Shikimato en la Cepa de *Escherichia coli* PB12.SA22

Susy Carmona*, Francisco Bolívar, Adelfo Escalante

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210, México.

adelfo@ibt.unam.mx

RESUMEN

El ácido shikímico (SA), uno de los intermediarios de la ruta común de biosíntesis de compuestos aromáticos o vía del ácido shikímico, presente en bacterias y plantas principalmente, es utilizado como precursor para la síntesis química del antiviral oseltamivir-fosfato. Dicho antiviral es utilizado para el tratamiento de la influenza común y en los casos de infección por los virus H5N1, H3N2 y A/H1N1. Ante el escenario de una pandemia de influenza, grupos de investigación han aplicado estrategias de ingeniería de vías metabólicas para la sobreproducción de SA en diferentes cepas de *Escherichia coli*. En este contexto, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la clonación del gen *zwf* que codifica para la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa en un vector multicopia, con la finalidad de desviar el flujo de carbono de la vía glicolítica a la vía de las pentosas en cepas recombinantes de *E. coli* y aumentar así la concentración del precursor eritrosa-4-fosfato y del cofactor $NADPH^+$ requeridos en la síntesis de SA. La cepa recombinante resultante PB12.SA23 presentó un aumento en la producción de SA del 14.1 %, respecto a la mejor cepa productora con que se contaba previamente. El análisis del efecto de la clonación del gene *zwf* sobre el nivel de expresión de genes del metabolismo central y de la vía del ácido shikímico en la cepa PB12.SA23 y cepas parentales, indican que el aumento en la producción de SA en la cepa PB12.SA23, es debido principalmente al aumento en la producción del cofactor NADPH.

Palabras clave: Ácido shikímico, Ingeniería de vías metabólicas*, zwf, E. coli.*

ABSTRACT

Shikimic acid (SA) is an intermediate of the shikimic acid pathway, which is the common route for the biosynthesis of aromatic compounds mainly in bacteria and plants. SA is used as a precursor for the chemical synthesis of the antiviral oseltamivir phosphate. This drug is used for treatment of seasonal flu and cases of H5N1, H3N2 and H1N1 virus infection. Given the potential scenario of a pandemic influenza, diverse research groups have implemented strategies of

engineering metabolic pathways for the overproduction of SA in different *Escherichia coli* strains. In these context, we evaluated the effect of *zwf* gene cloning in *E. coli* that codes for the enzyme glucose-6-P-dehydrogenase in a multicopy vector, in order to increase the carbon flux in the glycolytic pathway, pentose phosphate pathway and thereby increase the concentration of precursor erythrose 4-phosphate and cofactor NADPH required for the synthesis of SA. As result of this modification, the obtained strain designated as PB12.SA23 achieved an increment in the production of SA of 14.1% compared to the best producing strain that were available previously.
Key words: Shikimic acid, metabolic pathway engineering, *zwf, E. coli*.

INTRODUCCIÓN

El ácido shikímico (SA) ocupa un papel central en la vía común de biosíntesis de compuestos aromáticos, también llamada vía del ácido shikímico (VSA). Esta vía vincula el metabolismo central de carbono con la biosíntesis de los diversos compuestos aromáticos en organismos como plantas, bacterias y hongos ascomicetos principalmente. En el tronco principal de la vía, los precursores eritrosa 4-fosfato (E4P) y fosfoenolpiruvato (PEP) provenientes de la vía de las pentosas fosfato (PP) y glucólisis respectivamente, son convertidos a través de 7 reacciones enzimáticas en corismato (Fig. 1), el cual es el precursor para la biosíntesis de los aminoácidos y vitaminas aromáticas (Herrmann & Weaver, 1999).

El SA representa un compuesto de alto valor comercial ya que por la alta funcionalidad de su molécula: un anillo de 6 carbonos con tres centros asimétricos y un grupo funcional ácido carboxílico, es considerado como un atractivo bloque de construcción en la síntesis de varios compuestos tales como aditivos de alimentos, alimento para animales, inyectables, entre otros (Rawat & Tripathi, 2013); en recientes años ha ganado importancia por ser el compuesto base para la síntesis del antiviral oseltamivir-fosfato (OSF), inhibidor de la neuraminidasa del virus de la influenza, el cual es producido por Roche Pharmaceuticals bajo el nombre comercial de Tamiflu® para el tratamiento de virus de la influenza estacional A y B, y de la influenza aviar H5N1 y A/H1N1 (Ghosh *et al.,* 2012).

Actualmente, se emplean en el tratamiento de la influenza dos tipos de antivirales, los inhibidores de la proteína M2 como la Amantadina (Lysovir®, symmetrel syrup; Alliance Pharmaceuticals) y la Rimantadina (Flumadine®; Forest Pharmaceuticals), que evitan la replicación del virión (Burch *et al*., 2009) y los inhibidores de la neuraminidasa entre los que se encuentra el Zanamivir, medicamento nebulizado comercializado bajo el nombre de Relenza por Glaxo Wellcome y el OSF, [Jefferson *et al*., 2009]. Los primeros sin embargo, no son efectivos contra la influenza tipo B y por otro lado el

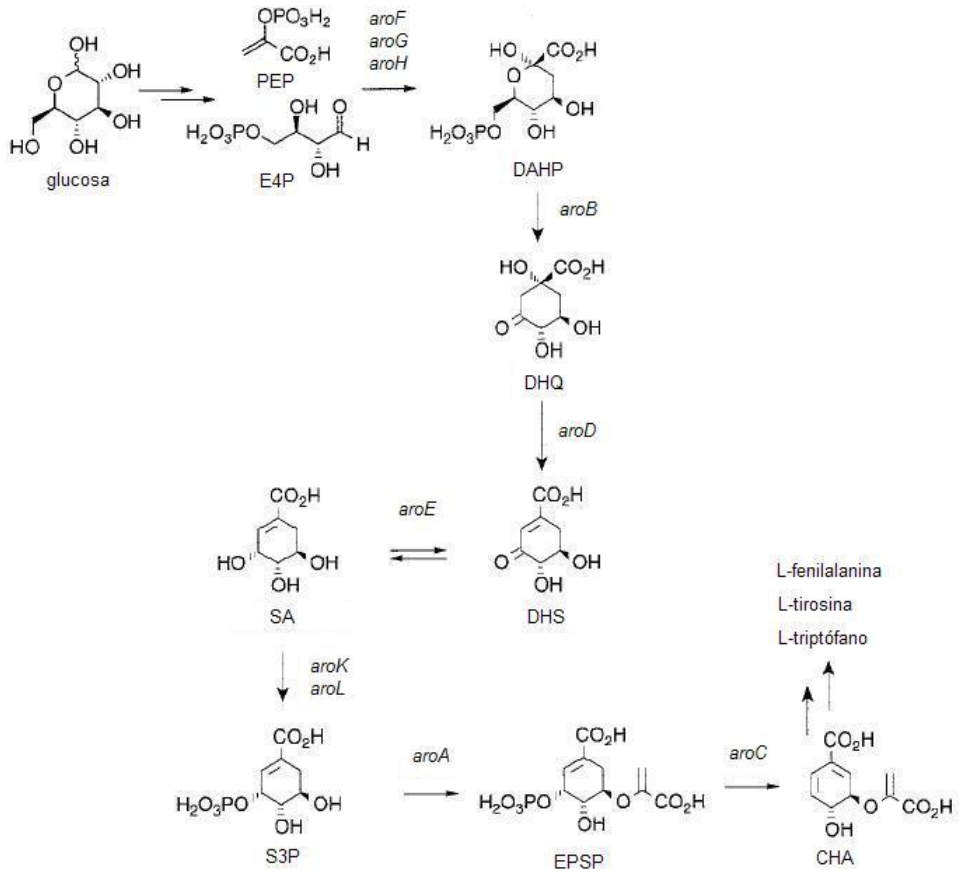


Fig. 1. Vía del ácido shikímico. Se indica cada uno de los intermediarios, así como los genes que codifican para las correspondientes enzimas de cada paso de la vía. *aroF, aroG, aroH*: isoenzimas DAHP sintasa; *aroB*: DHQ sintasa; *aroD*: DHQ dehidratasa, *aroE*: shikimato deshidrogenasa; *aroK, aroL*: shikimato cinasa I/II, *aroA*: EPSP sintasa; *aroC*: corismato sintasa; PEP:fosfoenolpiruvato; E4P: eritrosa-4-fosfato; DAHP: 3-deoxi-D-*arabino*-heptulosonato-7-fosfato; DHQ: 3-dehidroquinato; DHS: 3-dehidroshikimato; SA: shikimato; S3P: shikimato-3-fosfato; EPSP: 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato; CHA: corismato (modificado de Kai *et. al., 1999* y Knop *et. al.* 2001).

virus A/H1N1 resultó ser resistente a estos; los segundos, son efectivos tanto para la influenza A y B, y aunque se ha presentado resistencia, ésta es baja (Burch *et al*., 2009).

El Tamiflu® ha sido aprobado como el único medicamento oral disponible tanto para la profilaxis como para el tratamiento de la influenza humana A/H1N1 y la influenza H5N1 (Liang *et al*., 2009), ya que tras pruebas de laboratorio ha demostrado ser efectivo, disminuyendo eficaz y tempranamente los síntomas ocasionados

por el virus, incluyéndose así también en el tratamiento preventivo (Osores *et.al,* 2006); la Organización Mundial de la Salud lo ha recomendado para planes de pandemia (Jefferson *et al*., 2009).

El SA fue aislado por primera vez en 1885 del árbol japonés shikimi-no-ki (*Illicium anisatum*), actualmente se extrae de los frutos de la planta anís estrella chino *Illicium anisatum* e *Illicium verum* (Edmonds, 2005), obteniéndose 1.1 kg de SA por cada 30 kg de planta seca (Liang *et al*., 2009). Debido a que la disponibilidad de AS a partir del anís estrella chino depende de la disponibilidad del fruto, con el fin de mejorar la disponibilidad del SA, una alternativa a su extracción a partir de plantas, es la producción por sistemas de fermentación empleando microorganismos sobreproductores modificados genéticamente.

La ingeniería de vías metabólicas (IVM) se ha definido como el mejoramiento de las actividades celulares por manipulación de funciones enzimáticas, de transporte y regulatorias de la célula por el uso de la tecnología del ADN recombinante y en una definición más general como la modificación de la bioquímica celular por la introducción de nuevas propiedades o por modificación de las ya existentes (Kern *et al*., 2007).

En la obtención de cepas bacterianas sobreproductoras de SA, diversos grupos han empleado variadas técnicas que involucran ingeniería de los circuitos regulatorios, de los transportadores que participan en la toma de carbono del medio, de las vías glicolítica, de la vía de las PP y de síntesis de aromáticos (Ghosh *et al.,* 2012).

En este contexto, en nuestro grupo de investigación se han aplicado diversas estrategias de ingeniería de vías metabólicas (IVM), tales como:

i) *Obtención de cepas PTS$^-$Glc$^+$.* La disponibilidad de PEP hacía la VSA aumentaría al doble si la célula empleara para internalizar la glucosa un sistema PEP-independiente; bajo este enfoque, en nuestro grupo de trabajo se han obtenido cepas PTS$^-$ al inactivar el sistema fosfotransferasa de transporte de carbohidratos dependiente de PEP (PTS), mediante la deleción del operón *ptsHIcrr* (Flores *et al*., 1996; Flores *et al*., 2005); posteriormente, a través de un proceso de evolución adaptativa, la cepa de *E. coli* PB11 PTS$^-$Glc$^-$ (derivada de la cepa silvestre JM101), recuperó su capacidad de crecimiento en glucosa generando la cepa PB12 (PTS$^-$ Glc$^+$), cuyo fenotipo fue el resultado de la selección del transportador galactosa permeasa (GalP), sistema que no requiere de PEP, el cual fue seleccionado por la célula como alternativa para transportar la glucosa del medio, obteniendo así cepas con el fondo genético PTS$^-$Glc$^+$ (Flores *et al*., 1996; Flores *et al.,* 2005; Flores *et al* 2007; Aguilar *et al.,* 2012).

ii) la sobreexpresión del gen *tktA* codificante para la isoenzima transcetolasa I (TktA) de la vía de las PP resultando en el

incremento en la disponibilidad de E4P (Balderas *et al*., 2009),

iii) la clonación del gen que codifica para una versión insensible a inhibición alostérica de la isoenzima 3-deoxi-D-*arabino*-heptulosonato-7-fosfato sintasa AroG (*aroG*^{fbr}, feedback resistant) (Balderas *et al*., 2009), para evitar la inhibición de esta enzima por el aminoácido aromático fenilalanina,

iv) la sobreexpresión de los genes *aroB* y *aroE*, que codifican para las enzimas 3-dehidroquinato sintasa y shikimato deshidrogenasa respectivamente (Escalante *et al.,* 2010),

v) la inactivación de las isoenzimas shikimato cinasas I y II por interrupción de los genes *aroK* y *aroL,* respectivamente con el fin de lograr la acumulación de SA (Escalante *et al.,* 2010).

Se obtuvo de este modo la cepa derivada PB12.SA22 (Fig. 2) sobreproductora de SA (PB12 *aroG*^{fbr} *tktA aroB aroE ΔaroK ΔaroL*), la cual es capaz de producir 7.1 g /L de SA con un rendimiento de 0.29 mol SA/mol de glucosa, en sistemas de fermentación en lote en reactores de 1 L, con 500 mL de medio mineral suplementado con 25 g/L de glucosa y 15 g/L de extracto de levadura (Escalante *et al*., 2010).

La vía de las pentosas fosfato (PP) es una de las tres vías esenciales del metabolismo central, junto con la glicólisis y la vía Entner-Doudoroff; además de su papel como ruta de asimilación de azúcares como glucosa y pentosas, suministra en *E. coli* tres de los metabolitos precursores más importantes para las vías anabólicas de aminoácidos, vitaminas, nucleótidos y constituyentes celulares: D-ribosa-5-fosfato, sedoheptulosa-7-fosfato (S7P) y E4P, por lo que parte del carbono captado, debe fluir a través de esta vía para satisfacer las necesidades de la célula de estos metabolitos. La E4P como se ha mencionado, es uno de los sustratos clave para la formación de SA. La vía de las PP es además una fuente importante de NADPH, necesario también para las reacciones del anabolismo (Sprenger, 1995).

La enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, Zwf, codificada por el gen *zwf*), cataliza la primera reacción de la vía de las PP, siendo clave en el nodo glucólisis-vía de las PP; rinde poder reductor como NADPH, el cual es consumido durante la síntesis de SA por acción de la enzima shikimato deshidrogenasa codificada por el gen *aroE*.

Con la finalidad de aumentar la capacidad de producción de SA de la cepa PB12.SA22, se clonó el gen *zwf* en un plásmido de mediano número de copias, buscando incrementar el flujo de carbono hacia esta vía y con ello el aumento de la disponibilidad del sustrato E4P como precursor para la síntesis de SA. El NADPH generado por la reacción catalizada por la enzima Zwf puede ser empleado a su vez, por la enzima shikimato deshidrogenasa de la VSA, lo que se espera contribuya al incremento de la producción de SA.

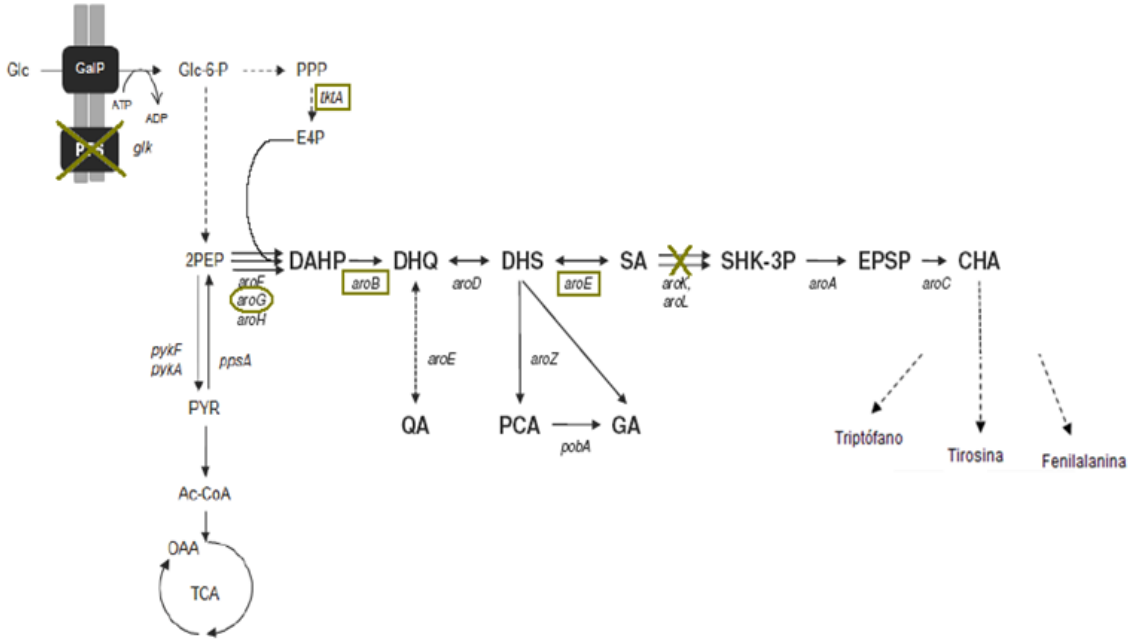


Fig. 2. IVM en el metabolismo central de carbono y VSA en cepas de *E. coli* PTS^{-} Glc^{+} para la sobreproducción de AS. Las X indican inactivación de reacciones por deleción de genes; el rectángulo indica que genes que se sobre-expresas; el ovalo indica que se trata de genes insensibles a inhibición alostérica; Las flechas punteadas representan dos o más reacciones. *glk:*glucocinasa; *tktA:* trancetolasa; *aroF, aroG, aroH*: isoenzimas DAHP sintasa; *aroB*: DHQ sintasa; *aroD*: DHQ dehidratasa, *aroE*: shikimato deshidrogenasa; *aroK, aroL*: shikimato cinasa I/II, *aroA*: EPSP sintasa; *aroC*: corismato sintasa Glc: glucosa; GalP: permeasa de galactosa; PTS: sistema fofotransferasa de transporte de carbohidratos; Glc-6-P: glucosa-6-fosfato; PP: vía de las pentosas fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; PYR: piruvato; Ac-CoA: acetil-coenzima A; TCA: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos; OAA: oxaloacetato; DAHP: 3-deoxi-D-*arabino*-heptulosonato-7-P; DHQ: 3-dehidroquinato; DHS: 3-dehidroshikimato; SA: shikimato; SHK-3P: shikimato 3 fosfato; EPSP: 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato; CHA: corismato (modificado de Escalante *et al*., 2010).

MATERIALES Y MÉTODOS

Construcción de la cepa PB12.SA23

Las cepas y los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la tabla 1. Se amplificó el gen *zwf* a partir del DNA cromosomal de la cepa *E. coli* JM101. El producto amplificado se clonó en el plásmido de mediano número de copias pTOPO*aroBaroE* generando el plásmido pTOPO*aroBaroEzwf,* con el que se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* TOP10. Se extrajo el DNA

plasmídico por lisis alcalina de estas células. Se prepararon células electrocompetentes de la cepa PB12.SA2, las cuales fueron transformadas con los plásmidos pJLB*aroG*^{fbr}*tktA* de alto número de copias (Balderas *et al*., 2009) y pTOPO*aroBaroEzwf*, se seleccionaron colonias en placas de agar LB con cloranfenicol (Cm) (20 µg/mL), kanamicina (Km) (30 µg/mL), tetraciclina (Tc) (30 µg/mL) y zeocina (Zn) (25 µg/mL). La cepa seleccionada fue llamada en este trabajo como PB12.SA23.

Tabla 1. Características de las cepas y plásmidos empleados.

Cepas	Características relevantes	Referencia
***E. coli* JM101**	*sup*E, *thi*, Δ(*lac-proAB*), F´	Bolívar *et al*., 1977
***E. coli* PB12**	JM101 Δ(*ptsH-I-crr*)::*kan* glc$^+$	Flores *et al.,* 1996
PB12.SA2	PB12Δ*aroL*Δ*aroK::cm*	Escalante *et al*., 2010
PB12.SA22	PB12.SA2 pJLB*aroG*^{fbr}*tkatA* pTOPO*aroBaroE*	Escalante *et al.,* 2010
PB12.SA23	PB12.SA2 pJLB*aroG*^{fbr}*tkatA* pTOPO*aroBaroEzwf*	Este trabajo
Plásmidos		
pTOPO*aroBaroE*	pCR®-Blunt II-TOPO®[Invitrogen™, 3.5Kb, gen letal *ccdB*, región operadora/promotora *lac*, Km^R, Zn^R, origen pUC] conteniendo los genes *aroB y aroE*	Escalante *et al*., 2010
pJLB*aroG*^{fbr}*tkatA*	pJLB*aroG*^{fbr} (*aroG*^{fbr} bajo el control del promotor lacUV5, los genes *lacI*^{q} y *tet*, resistencia a Tc y origen de replicación pACYC184) conteniendo el gen *tktA* con su promotor nativo.	Balderas *et al*., 2009
pTOPO*aroBaroEzwf*	pCR®-Blunt II-TOPO®[Invitrogen™, 3.5Kb, gen letal *ccdB*, región operadora/promotora *lac*, Km^R, Zn^R, origen pUC] conteniendo los genes *aroB, aroE y zwf*	Este trabajo

Medio y condiciones de cultivo

Se realizaron fermentaciones por triplicado de la cepa PB12.SA23 en jarras de un litro Autoclavable Bio Reactor (Applikon) equipado con las consolas: ADI 1010 Bio controller y ADI 1025 Bio console (Applikon) para controlar la temperatura, pH, agitación y aireación. Se utilizó un medio de

producción que consta de una base de medio mineral con la siguiente composición (g/L): K_2HPO_4 (7.5), ácido cítrico monohidratado (2.1), citrato amonio fierro (III) (0.3), H_2SO_4 concentrado 1.2 ml, $MgSO_4$ (0.64), $CaCl_2$ (0.06), $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (0.0037), $ZnSO_4$ (0.0029), H_3BO_3 (0.0247), $CuSO_4$ (0.0025), $MnCl_2$ (0.0158), $CoCl_2$ (0.00129), tiamina (0.001) (Li *et al*., 1999), suplementado con extracto de levadura (DIFCO) (15) y glucosa (J.T. Baker) (25), además de isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) como inductor a una concentración de 0.1 mM, el pH del medio se ajustó a 7 con NaOH 1N. Se adicionaron los antibióticos Cm (20 µg/mL), Km (30 µg/mL) y Tc (30 µg/mL).

Para iniciar la fermentación, se realizó un precultivo; a partir del stock de la cepa almacenado a -70 °C (glicerol) de la siguiente manera: se sembró una asada del glicerol en cajas de medio LB con antibióticos señalados y se incubó a 37°C, durante 12 h. A partir de las colonias desarrolladas, se inoculó un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL del medio de producción, más los antibióticos requeridos, incubando a 37°C y 300 rpm. Cuando este cultivo alcanzó un $D.O._{600nm}$ ~ 6 se tomó una alícuota para inocular cada fermentador con una $D.O._{600nm}$ = 0.3. Cada fermentador se mantuvo en las condiciones siguientes; 37°C, pH 7.0 (controlado mediante la adición de NH_4OH 10%), agitación entre 500 y 700 rpm para mantener los niveles de oxígeno disuelto a no menos de 20%, la aireación fue de 1 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto). La duración de las fermentaciones fue de 50 h.

Cuantificación de metabolitos.

Se tomaron muestras cada hora durante las primeras 8 horas y posteriormente cada 6 horas hasta el final del cultivo, se midió en el sobrenadante la concentración de SA, DHQ, DHS, ácido gálico (GA), ácido acético, glucosa y DAHP.

La cuantificación de los primeros cinco compuestos se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en un sistema Waters, Miliford, MA, el cual cuenta con una bomba 600E, inyector automático 717, un índice de refracción de 2410 y un detector de arreglo de diodos (996). Las muestras se analizaron en una columna Aminex HPX-87H (300x 7.8 mm; 9 µm) (Bio – Rad, Hércules, CA), utilizando una fase móvil de H_2SO_4 5 mM, un flujo de 0.5 mL/min y una temperatura de 50°C.

La glucosa contenida en cada una de las muestras se determinó en el sistema de cuantificación de glucosa (Biochemistry Analyser YSI 2700 Select), empleando como estándares una curva patrón de glucosa de 2, 4, 6, 8, 10 y 12.5 g/L.

El DAHP presente en las muestras se determinó por el ensayo colorimétrico del ácido tiobarbitúrico [Weissbach & Hurwitz, 1958].

Análisis del perfil de transcripción por qPCR tiempo real

De los cultivos de cada cepa (PB12.SA22, PB12.SA23, JM101 y PB12) a una$D.O._{600nm}$ = 1.0, se colectaron muestras a las cuales se extrajo el RNA total por el método de fenol caliente equilibrado en agua (Flores *et al*., 2005). Se comprobó su integridad por electroforesis en gel de agarosa para RNA, así mismo se cuantificó y comprobó su calidad por las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 (indican el grado de contaminación por proteínas y compuestos fenólicos, respectivamente). Para la síntesis del cDNA, se empleó el kit RevertAid^{TM} H First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas Inc.), usando una mezcla de cebadores específicos para los genes de interés (Flores *et al*., 2005). La reacción de síntesis de cDNA se realizó en un Termociclador GenAmp PCR System Perkin Elmer. La reacción de qPCR se llevó a cabo en el equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems) utilizando el kit SYBR Green PCR Master Mix (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

La técnica de cuantificación del nivel de expresión de los genes estudiados, fue el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak & Shmittgen (2001). Los datos obtenidos se normalizaron utilizando como control interno el gen constitutivo *ihfB* que codifica para la subunidad beta de un regulador transcripcional de unión a DNA, ya que se detecta el mismo nivel de expresión de este gen en todas las cepas bajo las condiciones de estudio. Para cada gen analizado, el nivel de transcripción del gen correspondiente en la cepa silvestre JM101 se consideró con un valor de 1.0 y se empleó como referencia para normalizar los datos de las cepas restantes, por lo que los datos de expresión de las cepas PB12, PB12.SA22 y PB12.SA23 se reportan como valores de expresión relativa comparados con el nivel de expresión de la cepa silvestre.

Los resultados presentados son el promedio de dos mediciones independientes de qPCR de valores obtenidos a partir de cDNA generados de muestras de fermentaciones independientes.

Cuantificación de la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD).

A partir de cultivos para la producción de SA con la cepa PB12.SA23, se cosecharon células a una $D.O._{600nm}$ = 1. Se tomaron muestras de 5 mL que se centrifugaron a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en buffer TRIS-HCl 100 mM (pH 7.5), centrifugando nuevamente bajo las mismas condiciones y decantando finalmente el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en 500 mL del mismo buffer. Manteniendo en hielo, las células resuspendidas se lisaron en un sonicador Ultrasonic Processor CV18, el extracto celular se centrifugó bajo las condiciones

antes mencionadas y se separó el sobrenadante, que fue utilizado como fuente de la enzima G6PD. La actividad se midió con el protocolo descrito por Shimizu & Peng (2003) por la cantidad de NADPH generado el cual absorbe a una longitud de onda de 340 nm. Las curvas de actividad y los valores de absorbancia se visualizaron en un espectrofotómetro Thermo Spectronic (BioMate 5). Para poder determinar la actividad específica, se midió la concentración total de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Construcción de la cepa PB12.SA23

Tomando como secuencia de referencia la región correspondiente del gen *zwf*, en el genoma de *E. coli* K12, se amplificó por PCR a partir del DNA cromosomal de la cepa JM101, un producto de 1579 pb que incluyen 93 pb antes del codón de inicio que contienen la región promotora (*soxS, marA* y *rob*), la región estructural y 22 pb después del codón de término; el producto de PCR fue clonando en el plásmido pTOPO*aroBaroE* resultando en el plásmido pTOPO*aroBaroEzwf* (Fig. 3). Se verificó la correcta orientación del gen clonado y que la secuencia del mismo no tuviera ninguna modificación. Este plásmido se transformó junto con el pJLB *aroG*^{fbr} *tktA* en la cepa PB12.SA2 dando como resultado le cepa PB12.SA23.

Evaluación del efecto de la clonación del gen zwf sobre la producción de SA, en sistemas de fermentación en lote.

La cepa PB12.SA23 muestra un crecimiento en dos etapas característico de las cepas PTS$^-$ glc$^+$ *aroK* $^-$*aroL*$^-$ (Fig. 4) (Escalante *et al*., 2010), la primera es de rápido crecimiento con bajo consumo de glucosa, mientras que la segunda es de lento crecimiento con elevado consumo de glucosa y un aumento en la producción de metabolitos. La cepa PB12.SA23 llega a su máxima D.O.$_{600nm}$ alrededor de las 10 horas de cultivo cuando entra a fase estacionaria; presenta una menor acumulación de biomasa en comparación con la cepa PB12.SA22 que era hasta ahora la mejor cepa productora obtenida en el grupo de investigación (Escalante *et al.,* 2010).

Reportes en la literatura indican que la sobreexpresión del gen *zwf* no tiene un efecto importante sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) manteniéndose constante (Nicolas *et al*., 2007); en nuestro caso podemos observar este efecto en la cepa PB12.SA23, cuyo valor de μ no es estadísticamente significativo al compararse con la μ de la cepa PB12.SA22 (Tabla 2). Los valores de μ fueron determinados con los valores de biomasa de la fase exponencial de la curva de crecimiento; los valores utilizados en cada caso tuvieron un coeficiente de correlación mayor a 0.98.

Como se ha mencionado, se observa una relación entre el crecimiento y el consumo de glucosa; durante la fase de

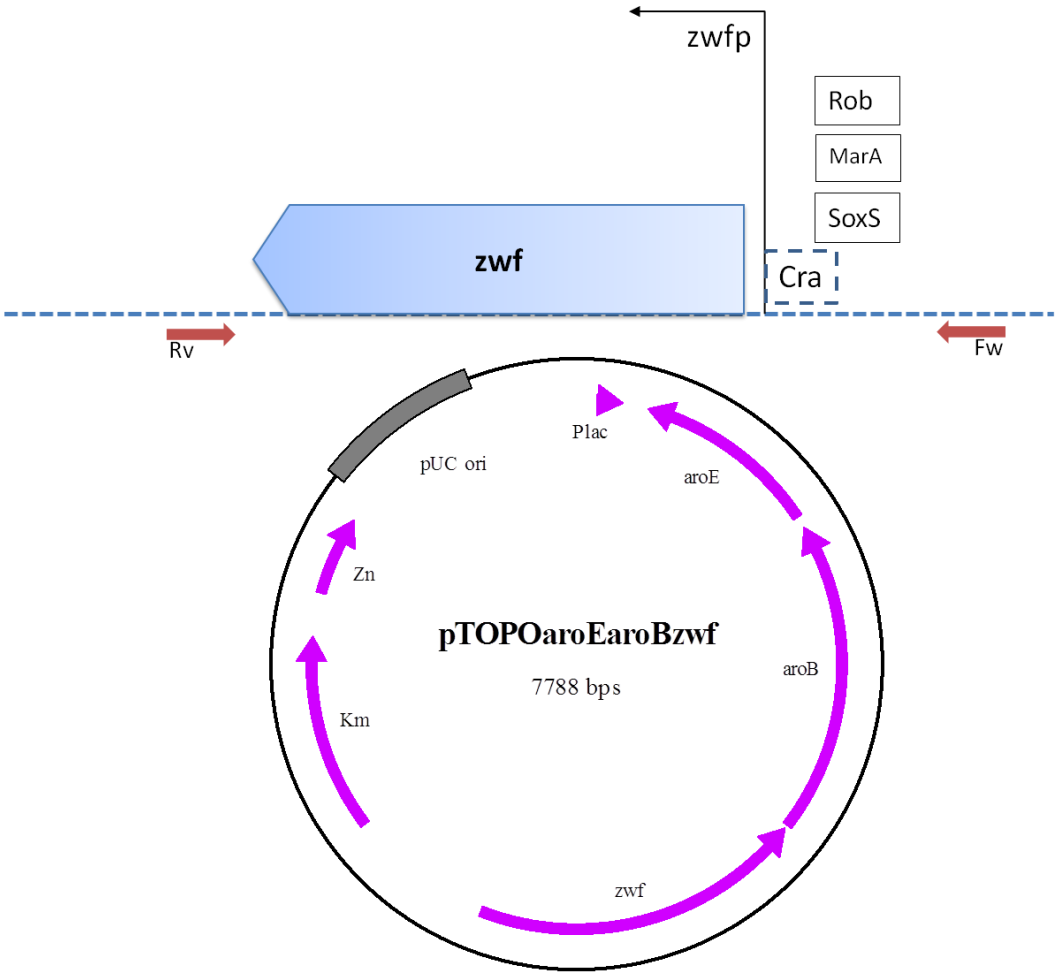


Fig. 3. Unidad transcriptional del gen *zwf* y clonación el plásmido pTOPO*aroEaroBzwf*. En la parte superior se muestra la unidad transcripcional del gen *zwf* en el genoma de *E. coli* (Keseler *et al.,* 2013); la región amplificada incluye tanto las regiones promotora y estructural del gen; el producto de PCR obtenido se clonó en el plásmido pTOPO*aroEaroB* que contiene una copia de los genes *aroB* y *aroE*, así como genes de resistencia a Kny Zn. En la parte inferior se muestra el plásmido resultante: pTOPO*aroEaroBzwf.*

crecimiento exponencial el consumo de glucosa es mínimo y aumenta el consumo a medida que el cultivo entra y avanza en la fase estacionaria hasta llegar a agotarla alrededor de las 45 horas de la fermentación

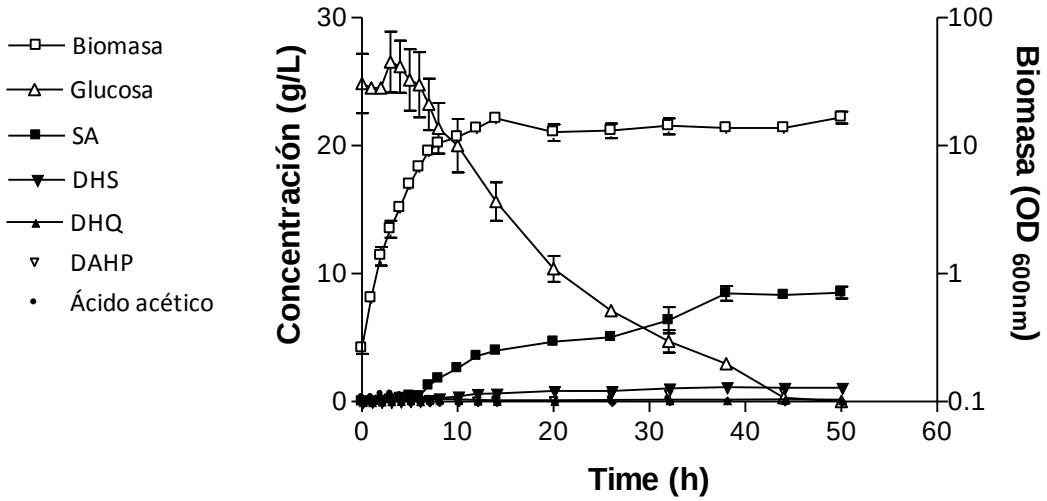


Fig. 4. Perfil de crecimiento, consumo de glucosa y producción de compuestos aromáticos de la cepa PB12.SA23. Se muestra el resultado del promedio de los datos obtenidos de tres fermentaciones independientes (para DAHP, solo es el resultado de dos) con sus correspondientes barras de error que indican la desviación estándar.

Tabla 2. Velocidad específica de crecimiento (μ) y velocidad de consumo de sustrato (q_s)

Cepa	μ (h^{-1})	q_s (milimol glc gDWC h-1)
PB12.SA22	0.42±0.01	1.93 ± 0.59
PB12.SA23	0.37±0.02	2.02 ± 0.29

(Fig. 5), a diferencia de la cepa PB12.SA22 que la termina en un menor tiempo (36 h). Como se observa en la Tabla 3, a excepción del SA, hay una disminución en las cantidades de intermediarios de la vía de aromáticos; esto le confiere a la cepa una ventaja en la producción de SA, ya que el carbono se dirige más eficientemente hasta la síntesis de SA y se presentarían menores dificultades en su extracción y purificación a partir de los caldos de cultivo, al tener menor cantidad de otros intermediarios de la VSA. En trabajos de otros grupos de investigación se reporta una acumulación aproximada de 1 g/L de DHS por cada 5 g/L de SA producido en cepas con diferentes fondos genéticos (Draths *et al*., 1999; Knop *et al*., 2001; Chandran *et al*., 2003). La proporción de DHS respecto a SA disminuyó en cultivos de la cepa PB12.SA23,

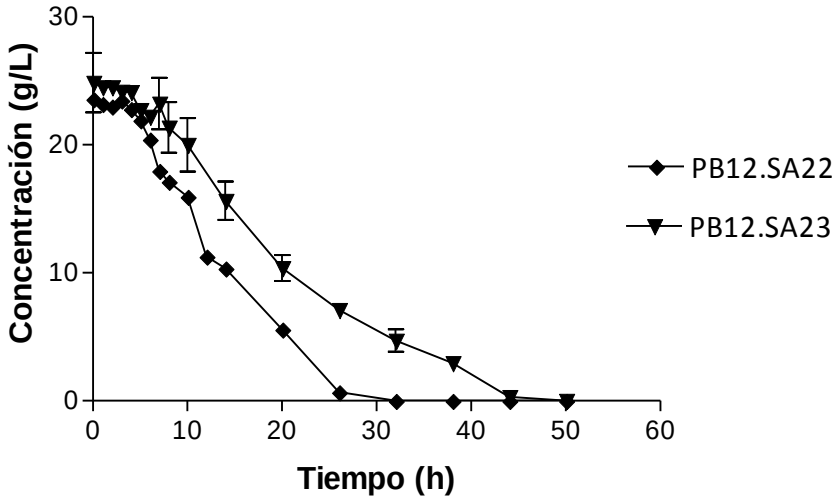


Fig. 5. Comparación del consumo de glucosa entre las cepas PB12.SA22 y PB12.SA23. Se muestra el resultado del promedio de los datos obtenidos de tres fermentaciones independientes para la cepa PB12.SA23 con sus correspondientes barras de error que indican la desviación estándar.

Tabla 3. Producción de SA y otros intermediarios de la VSA al final del cultivo.

Cepa	DAHP (g/L)	DHS (g/L)	SA (g/L)	GA (g/L)
PB12.SA22	0.81±0.04	1.46±0.14	7.05±0.06	0.08±0.01
PB12.SA23	0.70±0.001	1.09±0.09	8.52±0.79	0.03±0.0

obteniendo 1 g/L de DHS por cada 8 g/L de SA aproximadamente. Se ha propuesto la generación de un equilibrio hidroaromático (Knop *et al.*, 2001) cuando se acumula SA en cepas sobreproductoras, lo que tiene como consecuencia una reversión en el flujo de carbono de SA hacía DHS, con la co-formación de GA y QA (Li *et al*., 1999; Draths *et al*., 1999; Knop *et al.*, 2001), en este trabajo se detectó GA en concentraciones muy bajas (0.03 g/L) y no se detectó QA.

El título de SA alcanzado con la cepa PB12.SA23, es menor a la reportada en otros trabajos (Draths *et al*., 1999; Knop *et al*., 2001), con diferentes sistemas de fermentación (sistemas con alimentación de fuente de carbono); sin embargo, el

rendimiento con respecto a la fuente de carbono (glucosa), es mayor para la cepa construida en este trabajo, lo que resulta de mayor interés en el aspecto industrial, al reflejar un mejor aprovechamiento del sustrato empleado en el cultivo. La cepa PB12.SA22 brinda un rendimiento de 0.29 mol SA/ mol Glc que sobrepasaba el mejor valor reportado en la literatura por Chandran (2003). Con la cepa PB12.SA23, se logró aumentar el rendimiento a 0.37 mol SA/ mol Glc (Tabla 4). También se logró una mejora en el rendimiento de metabolitos aromáticos totales lo cual indica un mayor flujo de carbono hacia la VSA, con un mayor aprovechamiento del carbono.

Tabla 4. Comparación de la producción de metabolitos y rendimiento para cada cepa generada.

Cepa	Rendimiento SA (mol SA / mol glucosa)	Rendimiento de compuestos aromáticos totales* (mol compuestos aromáticos / mol glucosa)
PB12.SA22	0.29	0.37
PB12.SA23	0.35	0.42

*El rendimiento de aromáticos totales incluye todos los compuestos detectados en el medio de cultivo como resultado de la actividad de la VSA (DAHP, DHQ, DHS, SA, GA)

sedoAnálisis del perfil de transcripción por qPCR tiempo real

Para la mayoría de los genes analizados (Tabla 5), se observó un nivel de expresión mayor en la cepa PB12. En las cepas productoras de SA (PB12.SA) la expresión fue menor posiblemente debido al efecto de la carga metabólica que le confiere a estas cepas la presencia de dos plásmidos. Comparando las cepas productoras, se observa que los niveles de expresión de la mayoría de los genes analizados son más altos en la cepa PB12.SA23. Se ha observado que la sobreexpresión de *zwf* ayuda a contrarrestar efectos negativos de la carga metabólica (Flores *et al.,* 2004) y quizá este fenómeno se esté dando en esta cepa, teniendo así un metabolismo central más activo. La variación en el nivel de expresión de la mayoría de los genes analizados en las cepas PB12.SA respecto a la cepa PB12 se puede explicar además como una respuesta a las modificaciones genéticas realizadas en este cepa: inactivación de los genes *aroK* y *aroL* y la sobreexpresión de genes de la vía de las PP y de la VSA.

i) Transporte de glucosa

En la cepa PB12 (PTS^- glc^+) la glucosa

Tabla 5. Niveles de transcripción de las cepas PB12, PB12.SA22 y PB12.SA23 a 1 DO_{600nm}, creciendo en medio mineral suplementado con 25 g/L glucosa y 15 g/L de extracto de levadura.

Genes	Niveles de expresión como $2^{-\Delta\Delta CT}$ con JM101 como valor de normalización = 1.					
	PB12		PB12.SA22		PB12.SA23	
			Glicólisis y vía de las PP			
glk	3.17	(±0.08)	1.06	(±0.15)	1.84	(±0.33)
pgi	3.62	(±0.12)	2.24	(±0.01)	1.02	(±0.17)
eda	0.88	(±0.18)	1.13	(±0.15)	0.87	(±0.06)
edd	1.08	(±0.19)	0.18	(±0.06)	0.22	(±0.00)
gnd	1.24	(±0.47)	1.36	(±0.09)	1.38	(±0.04)
pgl	2.97	(±0.75)	1.70	(±0.01)	1.84	(±0.52)
rpe	1.09	(±0.20)	0.58	(±0.04)	0.66	(±0.05)
rpiA	2.60	(±0.69)	1.94	(±0.64)	1.44	(±0.22)
rpiB	1.24	(±0.18)	0.60	(±0.23)	1.04	(±0.18)
talA	7.43	(±1.45)	12.12	(±3.11)	32.27	(±4.57)
talB	3.01	(±0.77)	0.89	(±0.01)	1.19	(±0.11)
tktA	1.27	(±0.07)	16.24	(±2.85)	14.90	(±4.74)
tktB	8.37	(±1.61)	16.06	(±2.74)	34.00	(±2.83)
zwf	1.94	(±0.30)	1.57	(±0.11)	19.92	(±1.27)
			Genes que codifican para transportadores			
aroP	2.06	(±0.35)	1.12	(±0.13)	1.87	(±0.15)
shiA	1.45	(±0.07)	1.78	(±0.30)	1.45	(±0.33)
galP	21.76	(±4.98)	2.56	(±0.79)	4.08	(±0.98)
lamB	n.d.		0.05	(±0.00)	0.06	(±0.01)
malE	0.01	(±0.00)	0.12	(±0.11)	0.10	(±0.04)
mglB	242.04	(±9.16)	29.73	(±2.64)	43.04	(±8.52)
ompC	2.34	(±0.50)	1.01	(±0.24)	1.10	(±0.35)
ompF	n.d.		0.15	(±0.04)	0.96	(±0.16)
			VSA			

aroB	0.81	(±0.16)	3.58	(±0.59)	9.88	(±0.42)
aroD	1.40	(±0.12)	0.84	(±0.26)	0.89	(±0.19)
aroE	0.95	(±0.02)	41.88	(±0.49)	47.12	(±4.38)
aroF	0.86	(±0.16)	1.74	(±0.18)	1.29	(±0.04)
aroG	1.66	(±0.42)	20.95	(±0.43)	20.89	(±5.28)
aroH	2.26	(±0.51)	5.00	(±0.39)	3.25	(±0.37)
aroK	0.34	(±0.00)	0.00	(±0.00)	0.00	(±0.00)
aroL	0.60	(±0.05)	0.01	(±0.00)	0.00	(±0.00)
ydiB	2.92	(±0.32)	3.32	(±0.13)	2.28	(±0.47)

Se muestra como resultado, el promedio de dos mediciones independientes de RT-qPCR de valores obtenidos a partir de cDNA generados de muestras de fermentaciones independientes.

ingresa del periplasma al citoplasma principalmente vía las proteínas transportadoras codificadas por los genes *galP* y *mglB*, siendo la segunda proteína la principal responsable del transporte de glucosa en esta cepa bajo las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo, a diferencia de lo observado previamente para esta cepa en cultivos en medio mineral mínimo, en donde ambos transportadores tienen un nivel similar de transcripción [Flores *et al.,* 2005]. En las cepas PB12.SA se observa una disminución importante en el nivel de transcripción de estos dos genes respecto a la PB12, aunque en la cepa PB12.SA23 *mglB* presenta un nivel de expresión mayor (~10X) respecto a la cepa PB12.SA22. Debido a que la única diferencia entre las cepas PB12.SA22 y PB12.SA23 es la presencia de gen *zwf* en el plásmido, es probable que el incremento en el nivel de transcripción de *mglB* y su papel principal sobre el transporte de glucosa sea resultado de esta modificación genética. Es importante considerar también que es probable que durante la fase exponencial de cultivo, las cepas productoras PB12.SA estén utilizando algún componente del extracto de levadura como fuente de carbono, por lo que no se requiere un nivel de transcripción elevado de los transportadores de glucosa en las cepas productoras de SA bajo esta condición de cultivo, aunque esta situación parece presentarse únicamente en estas cepas y no en la PB12. De los genes que codifican para las porinas OmpC, OmpF y LamB, se observa un menor nivel de transcripción para el gen *lamB*.

ii) Glucólisis y vía de las pentosas fosfato

La cepa pB12.SA23 presenta un incremento en el nivel de expresión del gen *zwf,* ~12X respecto al nivel observado para las cepas PB12 y PB12.SA22, como resultado de su clonación en el plásmido pTOPO*aroBaroE.* Este aumento en el nivel de expresión está asociado con un aumento en la actividad de la enzima, lo que indica que el transcrito está siendo traducido y esto se refleja en la proteína funcional, al menos en los ensayos *in vitro.* Esto es indicativo de la importancia de la enzima Zwf en la canalización del carbono proveniente de la glicólisis hacia la vía de las PP en la cepa PB12.SA23 y hace sentido con los niveles de transcripción de los genes *glk* y *pgi.* Para ambos genes, hay un mayor nivel de transcrito en la cepa PB12 ya que esta consume más glucosa debido a que tiene una mayor tasa de crecimiento; en cuanto a las cepas productoras, *glk* tiene un nivel mayor de expresión en la cepa PB12.SA23, indicando que esta cepa está consumiendo más carbono que la PB12.SA22; el nivel de transcrito de *pgi* es menor en la cepa PB12.SA23 haciendo sentido con la sobreexpresión de *zwf* y la canalización de una parte del carbono hacia la vía de las PP.

A diferencia del alto nivel de expresión de *zwf* en la cepa PB12.SA23, el resto de los genes de la parte oxidativa de la vía de las PP *pgl* y *gnd* no presentaron cambios en su nivel de expresión con respecto a la cepa PB12.SA22. Los genes de la parte no oxidativa de la vía *rpe* y *rpiA* no presentan cambios en su nivel de expresión entre las cepas productoras PB12.SA; el gen *talA* presenta un nivel de expresión mayor en las cepas PB12.SA respecto a la PB12, y presenta también un nivel de expresión diferencial entre las cepas sobreproductoras: en la cepa PB12.SA23 está sobreexpresado 3X respecto a la cepa PB12.SA22, mientras que *talB* no presenta cambios entre las cepas PB12.SA. Las enzimas TalA y TalB catalizan, respectivamente la reacción reversible de S7P a fructosa-6-P y de gliceraldehído-3-foafato a E4P. El gen *talA* es regulado negativamente por ArcA y es importante destacar que en la cepa PB12, el sistema regulador de dos componentes ArcAB está inactivo por una mutación en *arcB,* lo que puede explicar el alto nivel en su expresión (Flores *et al.,* 2005; Salmon *et al.,* 2005). El nivel de expresión de los genes *tktA* y *tktB* es mayor en las cepas PB12.SA respecto a la PB12, sin embargo, también presentan una expresión diferencial entre las cepas productoras. Ambas cepas PB12.SA fueron transformadas con el plásmido pJLB*aroG*^{fbr}*tktA*, lo que explica el elevado nivel de expresión de *tktA*, sin embargo, en la cepa PB12.SA23 *tktB* presenta un nivel de expresión mayor (2X), respecto a la PB12.SA22. El gen *tktB* se encuentra en el mismo operón que *talA* y aunque no está reportado si ambos genes están regulados negativamente por ArcA, es probable que sea así y esto explique su elevado nivel de expresión en las cepas PB12.SA. Es importante mencionar que *tktB* presenta la

menor actividad de transcetolasa para la síntesis de E4P (Iida *et al.*, 1993).

iii) Vía del shikimato

Se observó en las cepas productoras un alto nivel de expresión de los genes clonados en los plásmidos pJLB*aroG*^{fbr}*tktA* y pTOPO*aroBaroEzwf*, mientras que los genes que codifican para el resto de las enzimas de la vía presentan el mismo nivel de expresión en la cepa PB12 y en las cepas productoras. Es importante destacar que en la cepa PB12.SA23 el nivel de expresión de los genes *aroB* y *aroE* (clonados en el plásmido pTOPO), son mayores que los observados para la cepa PB12.SA22, mientras que *aroG* (clonado en el plásmido pJLB), presenta un nivel similar de transcripción que en ambas cepas productoras. Estos resultados indican que más que exista un aumento en el flujo de carbono a través de la vía, hay un mejor aprovechamiento del carbono en la producción de SA.

CONCLUSIONES

La cepa PB12.SA23 que sobreexpresa el gen *zwf,* alcanza una producción de 8.52 g/L de SA, que corresponde a un aumento del 14.1% con respecto a la cepa productora PB12.SA22, lo que es resultado del incremento en el nivel de expresión del gen *zwf* y de la actividad de la proteína codificada por este gen.

El rendimiento logrado con la cepa PB12.SA23 de 0.37 mol SA/mol Glc es el mayor hasta ahora reportado para sistemas de fermentación similares al empleado en este trabajo (cultivos en lote).

La disminución en la cantidad de intermediarios, sobre todo de DHS en la cepa PB12.SA23, sugiere una mayor eficiencia de conversión de los distintos metabolitos hasta SA, probablemente asociada a una mayor disponibilidad del cofactor NADPH requerido en la conversión de DHS a SA. La disminución en la proporción de DHS respecto a la cantidad de SA producido, puede tener un impacto importante en el proceso de extracción y purificación del AS a partir de los sobrenadantes de los cultivos.

El presente trabajo constituye un avance significativo en la búsqueda de estrategias para incrementar los títulos y rendimientos en la producción de SA, sin embargo, para llegar a un proceso industrial, se necesitan evaluar diferentes enfoques tanto de IVM como de ingeniería de fermentaciones, sobre los que actualmente nos encontramos trabajando en nuestro grupo de investigación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por DGAPA-UNAM PAPIIT IN224709 e IN206812, FONSEC Salud-CONACYT 126793, CONACYT Ciencia Básica 105782.

REFERENCIAS

Balderas VE, Sabido A, Silva P, Cabrera N, Hernandez G, Baez JL, Martinez A, Bolivar F & Gosset G (2009) Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 8:1-19.

Bolívar F, Rodríguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heynecker HL, Boyer HW, Crosa JH & Falkow S (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*. 2:95-113.

Bradford M (1976) A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**.** *Analytical Biochemistry*. 72:248-254**.**

Burch J, Paulden M, Conti S, Stock C, Corbett M, Welton N, Ades A, Sutton A, Cooper N, Elliot A, Nicholson K, Duffy S, McKenna C, Stewart L, Westwood M & Palmer S (2009) Antiviral drugs for the treatment of influenza: a systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment.* 13:1-9.

Chandran S, Yi J, Draths K, Daeniken R, Weber W & Frost J (2003) Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnology Progress*.19:808-814.

Draths K, Knop D & Frost J (1999) Shikimic acid and quinic acid: replacing isolation from plant sources with recombinant microbial biocatalysis. *Journal of the American Chemical Society*. 121:1603-1604.

Edmonds M (2005) Isolation of shikimic acid from star aniseed. *Journal of Chemical Education*. 82:599-600.

Escalante A, Calderón R, Valdivia A, De anda R, Hernández G, Ramírez O, Gosset G & Bolívar F (2010) Metabolic engineering for the production of shikimic acid in a evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotranferase system. *Microbial Cell Factories*. 9:1-12.

Flores N, Xiao J, Berry A, Bolivar F & Valle F (1996) Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology.* 14:620-623.

Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G & Bolivar F (2005) Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in a *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metabolic Engineering*. 7:70-87.

Flores S, de Anda R, Gosset G & Bolivar F (2004) Growth-rate recovery of *Escherichia coli* cultures carrying a multicopy plasmid, by engineering of the pentose-phosphate pathway. *Biotechnology and Bioengineering*. 8:485-494.

Ghosh S, Chisti Y & Banerjee U (2012) Production of shikimic acid. *Biotechnology Advances*. 30:1425-1431.

Herrmann KM & Weaver LM (1999) The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*. 50:473-503.

Iida A, Teshiba S & Mizobuchi K (1993) Identification and characterization of the *tktB* gene encoding a second transketolase in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology.* 175:5375-5383.

Jefferson T, Jones M, Doshi P & Del Mar C (2009) Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults: systematic review and meta-analysis. *The British Medical Journal.* 339:b5106.

Kai L, Mikola M, Draths K, Worden R & Frost J (1999) Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 64:61-73.

Kern A, Tilley E, Hunter I, Legiša M & Glieder A (2007) Engineering primary metabolic pathways of industrial microorganisms. *Journal of Biotechnology*. 129:6–29.

Keseler I, Collado J, Santos A, Peralta M, Gama S, Muñoz L, Bonavides C, Paley S, Krummenacker M, Altman T, Kaipa P, Spaulding A, Pacheco J, Latendresse M, Fulcher C, Sarker M, Shearer A, Mackie A, Paulsen I, Gunsalus R & Karp P (2011) EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology. *Nucleic Acids Research*. 39:1-8.

Knop D, Draths K, Chandran S, Barker J, Daeniken R, Weber W & Frost J (2001) Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid. *Journal of the American Chemical Society.* 123:10173-10182.

Li K, Mikola M, Draths K, Worden R & Frost J (1999) Fed -batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 64:61-73.

Liang N, Xiao S, Kwang H & Wei L (2009) A short and practical synthesis of oseltamivir phosphate (Tamiflu) from (-)-shikimic acid. *The Journal of Organic Chemistry*. 74:3970-3973.

Livak K & Shmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-Δ ΔCT method. *Methods*. 25:402-408.

Nicolas C, Kiefer P, Letisse F, Krömer J, Massou S, Soucaille P, Wittmann C, Lindley N & Portais JC (2007) Response of the central metabolism of *Escherichia coli* to modified expression of the gene encoding the glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FEBS Letters*. 581:3771-3776.

Osores F, Cabezas C & Gómez J (2006) Influenza humana y aviar: amenaza de una pandemia humana. *Acta Médica Peruana*. 23: 35-47.

Rawat G & Tripathi P (2013) Expanding horizons of shikimic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 97:4277-4287.

Salmon K, Hung S, Steffen N, Krupp R, Baldi P, Hatfield G & Gunsalus R (2005) Global gene expression profiling in Escherichia coli K12: effects of oxygen availability and ArcA. *Journal of Biology and Chemistry*. 280:15084-96.

Shimizu K & Peng L (2003) Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 61:163–178.

Sprenger G (1995) Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12**.** *Archives of Microbiology*. 164:324-330.

Weissbach, A & Hurwitz J (1958) The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B. *Journal of Biological Chemistry*. 234, 705–709.

Vacunas de ADN Plasmídico: Una Herramienta Terapéutica Emergente

Gheorghe M. Borja[a]*, Octavio T. Ramírez[a] y Alvaro R. Lara[b]

[a]*Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Col. Chamilpa, CP 62210, Cuernavaca, Morelos, México. E-mail:* gmbz@biosustain.dtu.dk

[b]*Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe Cuajimalpa, Del. Cuajimalpa, D.F., C.P. 05300, México*

RESUMEN

El empleo de vectores no virales (plásmidos) para fines terapéuticos está cobrando cada vez mayor importancia, como lo evidencia el creciente número de evaluaciones clínicas empleando dichos vectores. Este tipo de vectores contiene elementos para su replicación en el hospedero (bacteria) y elementos para expresar la proteína antigénica de interés. Esto permite estimar que en un futuro cercano la demanda de ADN plasmídico (ADNp) aumentará sustancialmente. La producción de ADNp se realiza empleando *Escherichia coli* (*E. coli*) en cultivos de alta densidad celular para maximizar el rendimiento volumétrico. En esta revisión se analizaran la recientes trabajos que se han realizado en cepas como en los vectores para incrementar el rendimiento en producción de ADN plasmídico además de facilitar la purificación.

Palabras clave: ADN plasmídico, Vacunas de ADN, Sobreflujo metabólico, *E. coli*, Cultivos en modo lote, Acetato

ABSTRACT

The use of non-viral vectors (plasmids) for therapeutic purposes is gaining increasing importance, as evidenced by the growing number of clinical evaluations using these vectors. Such vectors contain elements for replication in the host (bacteria) and elements for expressing the antigenic protein of interest. This allows us to estimate that in the near future the demand for plasmid DNA (pDNA) will substantially increase. pDNA production is carried out using *Escherichia coli* (*E. coli*) in high cell density cultures to maximize volumetric efficiency. In this review we analyze the recent work that has been done both in strains and in vectors to increase the production yield of plasmid DNA, in addition to facilitating purification.

Key words: Plasmid DNA, DNA vaccines, Overflow metabolism, *E. coli*, Batch cultivation, Acetate

INTRODUCCION

Las vacunas de ADN plasmídico (ADNp) son plásmidos bacterianos construidos para expresar una proteína seguida de una administración *in vivo* seguida de una transfección a las células objetivo. Estos plásmidos funcionan como un sistema de transporte para el gen, resultando en la producción *in situ* del antígeno (para las vacunas) o proteína terapéutica (para aplicaciones de terapia génica). Se ha demostrado que un plásmido que codifica dicha proteína viral puede provocar la inmunidad celular y humoral, así como la protección cruzada contra la exposición viral. Este tipo de tecnología se ha utilizado para las aplicaciones de gran alcance desde el laboratorio hasta emplearlo como herramienta en vacunas veterinarias aprobadas por la FDA, y se encuentra en desarrollo para una variedad de aplicaciones terapéuticas en humanos. Este artículo examinará las características de una vacuna de ADNp, ventajas de las vacunas de ADNp, vacunas aprobadas por las FDA y pruebas clínicas, cepas empleadas para la producción de vacunas de ADN, cultivos de alta densidad celular de *Escherichia coli* y purificación de ADNp

CARACTERÍSTICAS DE LAS VACUNAS DE ADNp

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos con capacidad para autorreplicarse de forma controlada con ayuda de factores codificados en el ADN cromosómico del huésped y de forma coordinada con la división celular bacteriana (Lipps, 2008). En la mayoría de los casos son circulares, pudiendo variar en tamaño (<1-500 Kb) y en número de copias (1-500 copias/célula). La mayoría de los plásmidos son moléculas circulares de doble cadena sin extremos libres, esto es, cada nucleótido de cada hebra está unido de forma covalente al siguiente. A este tipo de plásmidos se les ha llamado ADN CCC (Covalently Closed Circular o isoforma circular relajada), aunque también existen plásmidos lineales en diferentes especies bacterianas y fúngicas. Los plásmidos se mantienen en las poblaciones bacterianas a través de procesos de transferencia vertical y horizontal. Aunque se suele considerar material genético dispensable, la mayoría de los plásmidos proporcionan una gran variedad de fenotipos a sus huéspedes, reportándoles algún tipo de ventaja adaptativa. Ejemplos de ello pueden ser la capacidad para degradar compuestos orgánicos, fijar nitrógeno, conferir resistencia a radiación, antibióticos o metales pesados. Así, los plásmidos pueden constituir entre un 1 y un 15% del genoma de muchas especies bacterianas (Holmes *et al.*, 1995) y representan vehículos portadores de genes que, dependiendo del número de copias del plásmido, se encuentran en dosis más

elevadas que en el cromosoma, y además pueden dispersarse por transferencia genética horizontal.

El ADNp es utilizado de manera rutinaria en experimentos de laboratorio para la transferencia y modificación de información genética. Desde que se demostró que los plásmidos que codifican para una proteína viral pueden desencadenar una respuesta inmune o celular sin tener efectos secundarios como las vacunas tradicionales (Donnelly *et al.*, 2003) los plásmidos han cobrado una creciente relevancia como vector en terapia génica y vacunación basada en ADN. Los plásmidos usados para este fin están construidos específicamente para codificar una proteína de interés, y son posteriormente administrados *in vivo* transfectando a las células de mamífero. Estos plásmidos están diseñados para expresar un antígeno de interés resultando en una producción *in situ* del antígeno (para vacunas) o una proteína terapéutica (para aplicaciones en terapia génica). El ADNp usado en este fin debe de contener elementos para la replicación y selección en hospederos bacterianos y para la expresión del antígeno en células eucariotas (Figura 1), además de cumplir con ciertas características de calidad y seguridad. Los elementos requeridos para la replicación en bacterias incluyen un origen de replicación y secuencias como RNAI/RNAII necesarias para la replicación, un gen de selección, necesario para la selección de transformantes exitosas en el hospedero bacteriano y generar una presión de selección para mantener una población predominante bacteriana que contiene el plásmido.

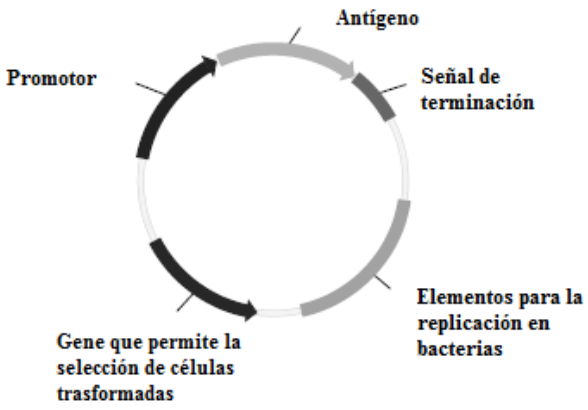


Fig. 1.- Elementos básicos de un vector para vacuna basada en ADN.

La FDA ha emitido la recomendación de que el ADNp, para ser empleado como fármaco, debe encontrarse en forma superenrrollada. Aunque dicha

recomendación no está plenamente justificada, se basa en estudios que han mostrado que dicha isoforma es más efectiva para la expresión del gene terapéutico en el paciente que la isoforma relajada o la lineal (Lahijani *et al.*, 1996; Prazeres *et al.*, 1999). Además la FDA sugiere que el contenido de ADNp de la isoforma superenrrolada debe contener mínimo un 80% de esta isoforma, para reducir el riesgo de recombinación inespecífica con el cromosoma del hospedero y/o la recombinación viral (Williams *et al.*, 2009; FDA, 2007). Además el contenido de ADN cromosomal del hospedero no debe de ser mayor a 10 ηg por dosis de ADN de hospedero (Tabla 1). Por otro lado, la cantidad de RNA y proteínas no debe de exceder el 1% de las dosis empleadas (WHO, 2007; Lahijani *et al.*, 1996).

Tabla 1. Requisitos de pureza para vacunas de ADNp.

Análisis	Contenido del lisado bacteriano	Niveles de aceptables en el producto final	Tipo de prueba
DNA	21%	< 0.2 µg/mg ADNp	qPCR, HPLC
Endonucleasas			Identidad
RNA	21%	< 0.2 µg/mg ADNp	qPCR, HPLC
ADNp	3-5%[1]	>97% sc ADNp[2]	CGE[3]
Endotoxinas	3%	< 10 E.U/mg ADNp	Prueba LAL
HCP	55%	< 3 µg/mg ADNp	Prueba BCA
DNA genómico	3%	< 2 µg/mg ADNp	qPCR
Otros	15%	No considerado	No considerado

[1] (Stadler *et al.*, 2004)
[2] Recomendación por parte de la FDA es > 80%
[3] Detección del ADN por absorbancia a 260 nm
Abreviaciones: qPCR= PCR cuantitativo; HPLC = Cromatografía liquida de alta resolución; ADNp= ADN plasmídico; CGE= Electroforesis capilar en gel; LAL =Ensayo de lisado; HCP= proteínas del hospedero; BCA =Ensayo de ácido bicinconínico

VENTAJAS DEL EMPLEO DE VACUNAS DE ADN PLASMÍDICO.

Los productos de la vacunación con ADN se expresan directamente en el tejido blanco, representando esto una ventaja cuando se trabaja con antígenos de difícil obtención, con una pureza alta, o en concentraciones elevadas, evitando así los riesgos de la manipulación de grandes concentraciones de patógenos y permitiendo seleccionar un objetivo específico, lo que no es posible con las vacunas clásicas (Fynan *et al.*, 1993) (Tabla 2). Además, se obtienen a un costo por debajo de las vacunas tradicionales, su producción es relativamente simple y la mayoría de los laboratorios están equipados para su producción en cantidades adecuadas para investigación, son de fácil

administración y su conservación y el transporte se ve favorecido por su estabilidad a temperatura ambiente, lo que al mismo tiempo elimina el requerimiento de una cadena de frío, facilitando una mayor accesibilidad geográfica y permitiendo llevar la vacunación hasta áreas remotas, debido a que el ADNp puede ser procesado como un precipitado seco y ser reconstituido con solo adicionar agua estéril previamente a la administración (Tabla 2) (Yokoyama *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1998; Bahloul *et al.*, 1998).

Tabla 2.- Comparación de las características de las vacunas actualmente empleadas

Tipo de vacuna	Ventajas	Desventajas	Ejemplo
Atenuadas	Presenta un respuesta inmune completa.	Poco estables Reversión.	BCG
Muertas	Respuesta inmune parcial	No hay inmunidad celular Empleo de adyuvantes	Tifoidea
Subunidades	Se puede producir en gran escala.	Empleo de adyuvantes.	*Haemophilus influenza* B (Hib)
Toxoides	Respuesta humoral. Se puede producir en gran escala.	Posibles reacciones adversas.	Toxoide tetánico
Vacunas de ADNp	Presenta un respuesta inmune completa. Diseño simple. Costos de producción bajos. No hay necesidad de cadena fría.	Integración del plásmido. Mutagénesis.	Melanoma canino

Las vacunas de ácidos nucleídos ofrecen una alternativa simple para la generación de respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) a diferencia de otros métodos como la inmunización con péptidos, limitada a su aplicación por la diversidad genética de las poblaciones humanas o virus atenuados, los cuales su uso puede ser restringido por cuestiones de seguridad como por ejemplo el VIH. Otra ventaja de estas, es la posibilidad de codificar múltiples secuencias antigénicas que incluyen algunos capaces de servir como inductores de determinados tipos de respuesta inmune (Tabla 2) (Donnelly *et al.*, 1994; Ouyang *et al.*, 2003; Shabaan *et al.*, 2003).

Una ventaja potencial de la vacunación con ADNp para diversas enfermedades virales es que mediante la expresión de proteínas virales *"in situ"* estas pueden tener

el mismo plegamiento, las mismas modificaciones transcripcionales y el mismo tipo de transporte intracelular ya que están siendo expresadas en células humanas (Deck *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; Donnelly *et al.*, 1997)

VACUNAS APROBADAS POR LAS FDA Y PRUEBAS CLÍNICAS.

A la fecha, tres vacunas de ADNp han sido autorizadas para uso veterinario, y una cuarta "vacuna de ADNp" ha sido aprobada como terapia génica para cerdos (Tabla 3). Estas vacunas autorizadas incluyen: una para una enfermedad viral de salmón, una vacuna para enfermedad viral para equinos y una vacuna para el cáncer en perros, así como el factor eliberador de la hormona crecimiento para cerdos. La eficacia de estas vacunas de ADNp y su aceptación como productos licenciados no solo aumenta la posibilidad de desarrollar plataformas tecnológicas para la investigación, desarrollo y producción de vacunas de ADNp para uso humano. La primera vacuna en aprobarse por la FDA fue la vacuna de ADNp contra el Virus del Oeste del Nilo (VON), autorizada en el 2005. Para demostrar su efectividad, primeramente se realizaron estudios clínicos en ratones (Kim *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2001), aves (Chattergoon *et al.*, 2000; Kilpatrick *et al.*, 2010) y finalmente en caballos (Kim *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2001). En el mismo año se autorizó la vacuna de ADNp para el salmón de criadero del Atlántico para evitar la infección por el virus de necrosis hematopoyética (NHI). La capacidad protectora de la vacuna de ADNp es específica para la proteína que esta codificada (en comparación con otras proteínas) (tabla 2) (Anderson *et al.*, 1996; Corbeil *et al.*, 1999; Lorenzen *et al.*, 1990). En el año 2007, La FDA aprobó la tercera vacuna de ADNp que codifica para el melanoma canino. Esta vacuna de ADNp codifica para la tirosinasa humana. Se ha demostrado que esta vacuna genera una respuesta inmune completa contra la tirosinasa de perro (Bergman *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2006). El resultado de esta vacuna, tiene como consecuencia alargar la vida de los perros incluso con un cuadro clínico avanzado (Bergman *et al.*, 2003). El cuarto plásmido aprobado por la FDA, en el 2008, es un plásmido que codifica para el factor liberador de la hormona crecimiento (GHRH), aplicado a cerdos. El resultado de la inyección del plásmido en cerdos disminuye drásticamente la morbilidad de los lechones (Khan *et al.*, 2010). La aprobación de esta tecnología de suministro de genes demuestra la factibilidad del empleo de la vacunación con ADNp, después de estudios de seguridad preclínicos y clínicos. Esto sugiere que en un futuro inmediato se aprobaran más vacunas de ADNp para su uso veterinario y/o humano.

Tabla 3.- Características de las vacunas de ADNp aprobadas

Producto	Compañía	Fecha de licencia y país
West Nile innovator®	Center of Cancer disease	2005 EUA
Apex-IHN ®	Novartis	2005 Canadá
Life Tide-SWS ®	VGX Animal Health	2007 Australia
Vacuna de Melanoma canina ®	Merial	2007 EUA

Actualmente no existe una vacuna de ADNp o terapia génica aprobada por la FDA. En recientes revisiones se han identificado más de 70 ensayos clínicos de ADNp (Kutzler y Weiner, 2008), de los cuales más de 60 ensayos clínicos fueron dirigidos contra el cáncer, dos de ellas estaban en la fase III de las pruebas clínicas. Sin embargo, hay numerosos estudios donde se han optimizado los vectores y la formulación de estos, esto nos permite saber que en un futuro cercano la demanda de ADNp se incrementará, lo cual se necesitaran procesos eficientes y efectivos para su producción (Carnes *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2009; Liu, 2011; Kutzler y Weiner, 2008).

VECTORES MEJORADOS PARA MANTENER LA SEGURIDAD DE LAS VACUNAS DE ADNp

Un punto importante en la producción de vacunas de ADNp es mantener y asegurar la fidelidad de la secuencia del gen antigénico ya que será administrado en humanos (Lara *et al.*, 2012). La secuencia integra de un plásmido de ADNp debe de estar controlada durante el proceso de producción debido al gran impacto que tiene en la calidad y rendimiento revisadas (Mairhofer y Lara, 2012). Modificaciones en las cepas y en el vector han sido empleadas en la producción del ADNp para asegurar que la secuencia y la estructura del plásmido se mantenga durante todo el proceso de producción. Actualmente la secuencia de la cepa de *E. coli* DH10B ha sido publicada (Durfee *et al.*, 2008) y demuestra que se necesita una reevaluación de las cepas productoras de ADNp. Por ejemplo, DH10B tiene una tasa de mutación 13.5 veces más alta que la cepa silvestre MG1655, esto se debe principalmente a las secuencias de inserción de transposición (SI). Cuando se comparó el genoma de la cepa MG1655 con las cepa DH10B, se encontró que DH10B tenía 5 copias adicionales de IS1A, IS1A son transposones que se sabe que se insertan en los vectores de ADNp (Chen y Yeh, 1997). Esta información es de suma relevancia para la producción de ADNp ya que la integridad del ADNp es fundamental para la vacunación. La contaminación del ADNp por

elementos móviles es un problema regulatorio muy importante a estudiar, ya que estos elementos pueden alterar las propiedades y la secuencia del vector de ADN.

Otro punto importante que puede afectar significativamente el diseño de la vacuna de ADNp, es que estos vectores incluyan un gen de resistencia a antibiótico.

En términos de la resistencia a los antibióticos, la FDA ha recomendado ampliamente que los antibióticos de origen β-lactámicos deben de ser evitados, debido a la contaminación residual en el producto final ya que puede causar una reacción alérgica en pacientes sensibles (Butler, 1996). Con este tipo de preocupaciones, el desarrollo de vectores de ADNp libres de genes resistentes a antibióticos es altamente deseado desde dos puntos de vista, el primero por el costo de producción y el segundo por la seguridad. Diversos grupos de investigación han reportado modificaciones en el vector, hospedero y ambos para desarrollar sistemas de selección alternativos. Estos avances han sido revisados recientemente (Vandermeulen *et al.*, 2011) algunos ejemplos claves se discutirán enseguida. Diversos grupos han elegido manipular genes esenciales de *E. coli* para asegurar eliminar las células libres de plásmido. Un grupo escogió el gen *dapD*, un gen esencial que codifica para la síntesis de Lisina (Cranenburgh *et al.*, 2001). El locus de *dapD* fue sustituido por el mismo gen de *dapD* bajo el control del promotor *lac*. Como consecuencia solo las células que contenían el plásmido con el gen *lac* podían sobrevivir en el cultivo.

Un novedoso vector/hospedero se desarrolló por Soubrier y col. (1999) combinando la selección sin antibiótico que es dependiente de la replicación del hospedero. Este tipo de plásmidos, pCOR, contiene un origen de replicación R6K el cual requiere la proteína Pi codificada por el gene *pir*. En este sistema, el gene *pir* fue eliminado del plásmido e integrado al genoma de *E. coli*. El sistema dependiente del hospedero mejora el substancialmente la segregación del plásmido además de ser un sistema que no necesita de un gen de resistencia a antibiótico. Con este sistema se han alcanzado rendimientos de hasta 421mgADNp/L en cultivos alimentados de 7 L (Soubrier *et al.*, 2005). Los plásmidos pCOR representan hasta ahora los únicos vectores que no contienen el origen de replicación pCOlE1 para vectores de terapia génica y vacunas de ADNp.

CEPAS EMPLEADAS PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS DE ADNp

La producción de plásmidos para vacunas de ADN se ha abordado desde diversos puntos, tales como el desarrollo de cepas (Okonkowski *et al.*, 2005), medios de cultivo (Okonkowski *et al.*, 2005); (O'Kennedy *et al.*, 2000; Wang, 2001), y estrategias de inducción por temperatura (Carnes *et al.*, 2006). La cepa seleccionada para la producción debe producir un alto número de copias del plásmido de interés, poseer alta

estabilidad segregacional y mantener un alto nivel de superenrrollamiento del plásmido. También debe tener una baja tasa de mutación y de intercambio de información genética con el plásmido.

El ADNp con fines terapéuticos es típicamente producido en cepas no patógenas de *E. coli* derivadas de su progenitora *E. coli* K-12, como las cepas DH5α (Carnes *et al.*, 2006). La Tabla 4 compara los genotipos relevantes empleados en la producción de ADNp

Tabla 4.- Cepas comúnmente reportadas para la producción de ADNp.

Cepa	Genotipo	Fuente
B	LE392.23 [F′*lacI*q*Z*::*M15 proAB* Tn*10* (Tetr)]	ATCC33849
K-12	F^- λ $^-$ *ilvG*$^-$ *rfb*$^-$50 *rph*$^-$1	ATCC33849
BL21	B λ^- *dcm ompT hsdS gal*	Stratagene
DH1	F^- λ^- supE44 hsdR17 *recA*1 gyrA96 relA1 *endA*1 thi$^-$1	ATCC33849
DH5α	F^- 80lacZ M15 (lacZYA-argF)U169 *recA*1 *endA*1 hsdR17(rk^- mk^+) phoA supE44 thi$^-$1 gyrA96 relA1	Invitrogen
JM105	F- Δ(*lac proAB*) *lacIq thi repsL endA*l slcB15 hadR4 traD36 *proAB* Δ(ZM15)	Pharmacia
JM109	e14$^-$(McrA$^-$) *recA*1 *endA*1 gyrA96 thi1$^-$ hsdR17(rK^-mK^+) *supE44 relA1*$^-$(*lac-proAB*) [F' traD36 *proAB lacIqZ*ΔM15]	Promega

Además de DH5α, otras cepas como BL21 (Listner *et al.*, 2006), DH1 (Cooke *et al.*, 2004; Rozkov *et al.*, 2004) JM108 (Huber, 2005) SCS1-L (Singer *et al.*, 2009) o DH10B (Lahijani *et al.*, 1996) han sido reportadas para la producción de ADNp, debido a su fondo genético. En la Tabla 4 se presentan los genotipos relevantes de las cepas más reportadas para la producción de ADN plasmídico. Como se puede observar en la Tabla 4, varias de estas cepas son comerciales. Hasta el momento no existe una cepa que pueda ser catalogada como la mejor productora en general.

En un estudio reciente se evaluó la producción de ADNp y su superenrrollamiento por 17 diferentes cepas de *E. coli* (Yau *et al.*, 2008). Se evaluó la producción de dos plásmidos, de diferente tamaño (5.8 y 6.9 kb). Los autores concluyeron que no es posible establecer una correlación directa entre el genotipo de las cepas estudiadas y el rendimiento y superenrrollamiento del ADNp producido. Sin embargo, la cepa DH5α consistentemente se encontró como una de las mejores productoras. Debido a esto y a que los valores de producción de ADNp más altos

reportados se han logrado con esta cepa (Carnes, 2009), la cepa DH5α será usada para la comparación de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Hasta el momento, existen pocos ejemplos reportados sobre la modificación genética de *E. coli* para incrementar la cantidad de ADNp producido. Recientemente, el empleo de una cepa BL21 modificada, derivada de *E. coli* B, ha mostrado altos rendimientos como cepa de producción (Phue *et al.*, 2008).

Se ha reportado que al emplear una cepa BL21 Δ*recA* se logró una mayor producción de ADNp en comparación con la comercial DH5α (Phue *et al.*, 2008). En las mismas condiciones, las cepas derivadas de BL21 presentaron menor acumulación de acetato y mejoraron la asimilación de glucosa. Cuando se empleó glicerol como fuente de carbono, el desempeño de BL21Δ*recAendA* fue mejor que DH5α en términos de rendimiento volumétrico. En contraste, no hubo una diferencia notable en el rendimiento específico.

Desde el punto de vista metabólico, la cepa B comparada con la K-12, produce menos acetato, incluso cuando el medio contiene altas concentraciones de glucosa. Este fenómeno se atribuye a que esta cepa tiene más activo el ciclo del glioxilato y consecuentemente las vías de oxidación del acetato están más activas (Phue *et al.*, 2005)

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que la cepa VH33 (W3110 PTS^- $GalP^+$) es capaz de producir más del doble de ADNp que su cepa parental (W3110), y debido a su baja producción de acetato, alcanzó altas densidades celulares en modo lote (Soto, 2011).

Además de la menor producción de acetato, se ha hipotetizado que el flujo de carbono hacia la vía de las pentosas fosfato incrementado en las cepas PTS^- (Flores *et al.*, 2002) podría beneficiar la producción de bases nitrogenadas necesarias para la síntesis de ADN. Dicha hipótesis se vio reforzada cuando el flujo de carbono a través de la piruvato cinasa fue reducido al inactivar el gene *pykA* en VH33, lo que condujo a un incremento de casi el doble de la cantidad de ADNp producido por VH33 (Pablos *et al.,* 2012). Sin embargo, los rendimientos alcanzados por VH33 y VH33 $pykA^-$ son todavía inferiores a los alcanzados por cepas comerciales.

Por otro lado, Wunderlich y colaboradores (2013), evaluaron los parámetros cinéticos y estequiométricos durante la producción de ADNp. Se evaluó de la velocidad específica de las cepas VH33 y VH34 con su cepa parental W3110. Se evaluaron rangos de 0.02 a 0.25 h^{-1}. La cepa VH34 tiene una mutación adicional *pykA*, la cual condujo a un aumento significativo del rendimiento y la productividad del ADNp. Estos resultados fueron 60% superiores al de las cepas W3110 y VH33. Además los flujos metabólicos calculados mostraron diferencias principalmente en las reacciones catalizadas por la piruvato cinasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Estos resultados obtenidos

son útiles para el diseño de cultivos y la producción de ADNp en *E. coli* (Wunderlich *et al.,* 2013).

CULTIVOS DE ALTA DENSIDAD CELULAR DE *Escherichia coli*

Una forma de aumentar la productividad de los bioprocesos es aumentar al máximo la cantidad de biocatalizador (células) en el bioreactor. Los cultivos de alta densidad celular de *E. coli* llegan a concentraciones de biomasa (medida como peso seco) de al menos 40 g/L (aunque no existe una concentración universalmente aceptada para emplear el término de "alta densidad celular"). Para lograr esto, se deben añadir cantidades de glucosa (la fuente usual de carbono) mayores a 80 g/L. En el caso de *E. coli*, la cantidad de glucosa inicial rara vez excede los 20 g/L de glucosa, principalmente debido a la acumulación de metabolitos de desecho como el acetato, que tiene un impacto negativo en la fisiología microbiana. El acetato es producido por *E. coli* bajo condiciones aerobias debido al sobreflujo metabólico, definido como un desbalance de la vía glicolítica y la vía de los ácidos tricarboxílicos (Eiteman y Altman, 2006). Una estrategia típica para evitar el sobreflujo metabólico y obtener altas densidades celulares es la operación del cultivo en modo lote alimentado, el cual consiste en una fase lote de corta duración seguida de una fase de alimentación de sustrato a una tasa tal que se evite el sobreflujo metabólico. La alimentación del sustrato puede manejarse con un perfil constante o con incremento lineal. También puede operarse una tasa de alimentación con incremento exponencial, lo que permite además controlar la velocidad específica de crecimiento de las células y con ello mantener condiciones fisiológicas relativamente definidas (Pablos *et al.*, 2011).

El cultivo por lote alimentado es el modo de operación más usado en la industria. Posee la ventaja de que se evita el sobreflujo metabólico y debido a que la velocidad específica de crecimiento es reducida, la velocidad de consumo de oxígeno se disminuye también, lo que es relevante ya que la velocidad de transferencia de oxígeno de los bioreactores suele ser limitante para la obtención de altas densidades celulares de cultivos aerobios (Knabben *et al.*, 2010; Lara, 2011). Sin embargo, los cultivos por lote alimentado tienen una serie de desventajas: requieren de sistemas de control sofisticados e información fisiológica de la cepa que no siempre están disponibles en etapas tempranas de desarrollo del producto, la operación de cultivos alimentados a escala industrial usualmente resulta en gradientes espaciales de sustrato y oxígeno disuelto debido al mezclado ineficiente a escala industrial (De Anda *et al.*, 2006; Lara, 2011), además de que resultan considerablemente más largos, comparados a cultivos por lote (Lara *et al.*, 2009).

Por otro lado, se realizaron modificaciones genéticas en una cepa de *E. coli* con un sistema alterno de transporte de glucosa (VH33), con la finalidad de

incrementar la producción de ADNp. De las diferentes alternativas estudiadas, la inactivación combinada de los genes *recA*, *nupG* y *deoR* incrementaron a más del doble (4.22 mg/g) el contenido específico de ADNp en la cepa triple mutante, comparada con VH33 (Borja *et al.*, 2012). La cepa triple mutante VH33 Δ(*nupG deoR recA*) retuvo además la ventaja de poseer un muy bajo sobreflujo metabólico. Ello permitió cultivarla exitosamente en modo lote empleando 100 g/L de glucosa, con lo que fue posible obtener más de 180 mg/L de ADNp, más del doble de lo producido por una cepa comercial bajo las mismas condiciones (Borja *et al.*, 2012). Esto resulta una aportación particularmente valiosa para acelerar el desarrollo de productos basados en ADNp desde etapas tempranas, en los que la aplicación de métodos sofisticados de cultivo como el lote alimentado no siempre están disponibles.

INCREMENTO DEL CONTENIDO ESPECIFICO DE ADNp POR CAMBIO DE TEMPERATURA

La tasa de calentamiento es un parámetro importante en los bioprocesos inducidos térmicamente (Caspeta *et al.*, 2009), ya que al evaluar la inducción por temperatura en la producción de proteína recombinante en cultivos de *E. coli* BL21 con incremento de temperatura de 30 a 42 ºC a tasas de calentamiento de 6, 1.7, 0.8 y 0.4 °C/min, típicas de fermentadores de 0.1, 5, 20 y 100 m^3, respectivamente, han probado su efectividad como herramienta de bioproceso.

Los vectores de ADNp son derivados del plásmido pUC, estos últimos difieren de los plásmidos pBR322 en la secuencia de RNAI. La secuencia consiste en una mutación puntual de A/G, teniendo como resultado la diferencia de la estructura secundaria de RNAII, esta mutación permite incrementar el número de copias del plásmido de 20 a 50 en cultivos de *E. coli* a 37 ºC (Lin-Chao *et al*., 1992). Con esta construcción se ha demostrado que el número de copias de plásmido incrementa un orden de magnitud al hacer cultivos a 42 °C (Miki *et al*., 1987).

Estudios realizados en cultivos de alta densidad operados en lote alimentado, con un cambio de temperatura de 35 a 42 °C, con tasas de calentamiento de 0, 0.025, 0.05, 0.10 y 0.25 °C/min, que pueden tener lugar durante el calentamiento en reactores de gran escala. Estudios realizados por Jaén y col. (2013) con tasas de calentamiento entre 0 y 0.10 °C/min permitieron incrementar el rendimiento específico y la productividad de ADNp hasta 79 y 250%, respectivamente, siendo la mejor condición de calentamiento 0.05 °C/min, en la que el rendimiento específico de ADNp fue de 9.29 ± 0.59 mg/g, la productividad de 0.56 ± 0.06 mg/g·h y el contenido de plásmido superenrollado de 80 ± 5%.

PURIFICACIÓN

El material de partida después de la cosecha y la lisis alcalina de la fermentación

bacteriana es una mezcla compleja donde el ADN plasmídico puede constituir hasta el 5% del contenido nucleico total de la célula (Birnboim y Doly, 1979). El ADNp producido en *E. coli* presenta tres isoformas diferentes, tales como la lineal, la circular abierta (OC) y la superenrollada (SC). En la forma superenrrolada (SC) ambas hebras están cerradas y el plásmido exhibe una estructura compacta. Si una cadena se rompe, el enrollamiento es perdido y el plásmido se presenta en forma circular, abierta y relajada. La isoforma lineal son aquellas cadenas que se rompen al mismo tiempo y en la misma posición. Otras isoformas, aunque menos comunes son los oligómeros (Horn *et al.*, 1995). En general se supone que la eficacia de la expresión de genes es dependiente principalmente de la isoforma de plásmido superenrollado. Esta última es de gran interés ya que la FDA recomienda que para las vacunas de ADNp debe de contener más del 80 % de la isoforma superenrrolada (SC) (Tabla 1). Por esta razón, otras isoformas deben mantenerse al mínimo (Przybycien *et al.*, 2004). Por lo tanto, los procesos de purificación de ADN plasmídico deben ser diseñados con el fin de evitar otras isoformas. El principal contaminante durante la purificación de plásmido ADN es ARN, pero la calidad del producto final también depende de ADN genómico, endotoxinas y proteínas del hospedero (Tabla 1). El análisis incluye comúnmente la medición de niveles de trazas de estos contaminantes, que establece altas exigencias en los métodos de análisis, cuando el tiempo y el costo es un factor importante.

Por otra parte, cualquier material para ser utilizado para aplicaciones médicas debe ser producido bajo buenas prácticas de fabricación (GMP) procedimientos compatibles (Yi *et al.*, 2005; Trindade *et al.*, 2005; Diogo *et al.*, 2005) para satisfacer los estrictos requisitos de pureza de acuerdo con los organismos regulatorios (Kutzler y Weiner, 2008; Prud'homme, 2005). Esto también puede requerir el uso de las especificaciones aprobadas, tales como los descritos en la Farmacopea Europea (Yi *et al.*, 2005). Una lista de los requisitos reglamentarios actuales para aplicaciones médicas ADNp se muestra en la Tabla 1. La herramienta principal y central para la purificación del ADNp ha sido la cromatografía, a continuación se revisaran los aspectos más importantes de purificación de ADNp.

Purificación por cromatografía de ADNp

La cromatografía es un método bien caracterizado y bien establecido para la purificación de proteínas en la industria farmacéutica y considera el método con la resolución y reproducibilidad más alta (Przybycien *et al.*, 2004). Por lo tanto, es una de las técnicas que ha sido ampliamente exploradas en sistemas de purificación de ADNp. Varias características físico-químicas (Tabla 5) de ya sea el ADNp o de sus impurezas (Tabla 1), puede ser explotado a través de interacciones selectivas con

cromatografía sólida. Propiedades tales como el tamaño, carga, hidrofobicidad, conformación y accesibilidad de los grupos moleculares han sido estudiadas. Una extensa revisión de la matrices cromatográficas actualmente disponibles para la separación de ADN plasmidíco se le ha dado por Diogo y col. (2005). (Diogo *et al.*, 2005)

Tabla 5.- Comparación de las propiedades físico químicas de las proteínas y los plásmidos. Adaptado de Urthaler *et al.,* 2005

Característica	Proteínas	ADN plasmídico
Precursores	Amino ácidos	Ácidos nucléicos
Peso molecular	10^3-10^5	10^6-10^7
Radio de Stokes	5 nm	100-300 nm
Carga	Depende de pI/pH	negativa
Coeficiente de difusión	Media-alta	Baja
Viscosidad	Baja	Alta
Esfuerzo de corte	Baja	Alta

El tamaño de los plásmidos tiene una influencia en l

Cromatografía de intercambio iónico

Cromatografía de intercambio iónico (AEXC) es el método más utilizado para la captura primaria de ADNp con más de 81% de las patentes dentro de los métodos de purificación de ADN (Ghose *et al.*, 2004). AEXC explora las interacciones electrostáticas entre el plásmido cargado negativamente y la resina de fase estacionaria, grupos cargados positivamente, tales como aminas cuaternarias. La principal limitación de esta técnica es la co-purificación de polímeros iónicos de estructura similar y de carga del ADNp, tales como ADN genómico, endotoxinas y RNA (Wicks *et al.*, 1995). Por lo tanto, las etapas de purificación adicionales son necesarias, el aumento de los costos operativos (Tabla 5). Otras desventajas de cromatografía AEX son la baja capacidad relativa para el ADNp, y su elución en grandes sales tampones. No obstante, algunas resinas de AEXC, se ha demostrado que son altamente selectivas para la isoforma superenrollada de ADNp (que tienen mayor densidad de carga) (Prazeres *et al.*, 1998). Este es uno de las principales ventajas de esta técnica. La eliminación eficaz de ARN (aunque por lo general con el pre-tratamiento del lisado con RNasa), y oligonucleótidos algunas proteínas son las otras principales ventajas de este método cromatográfico (Diogo *et al.*, 2005).

Cromatografía de exclusión por tamaño

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) explora las diferencias de tamaño hidrodinámico del plásmido y sus impurezas en lugar del proceso de adsorción con el fin de purificar la molécula objetivo. Para lograr una buena separación entre dos especies, se requiere que las dos moléculas difieren en tamaño por 2 veces, de otro modo la co-elución de las dos especies obtenidas es limitada (Li *et al.*, 2007). Con este tipo de herramienta se pueden eliminar las impurezas, tales como ARN y proteínas descritas en la Tabla 5 (Bywater *et al.*, 1983; Li *et al.*, 2007). Por lo tanto, las principales desventajas de este enfoque son los co-elución de impurezas con un tamaño similar al ADNp, la limitada ampliación de la escala de producción; y los altos factores de dilución que puedan resultar desventajosos, en términos de proceso (Diogo *et al.*, 2005). Por lo tanto, se aplica SEC más a menudo en las etapas posteriores del proceso de purificación de ADNp para la etapa de formulación.

Cromatografía de interacción hidrofóbica

La cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) se ha utilizado para purificar ADNp (Diogo *et al.*, 2005; Diogo *et al.*, 1999; Trindade *et al.*, 2005) HIC hace uso de la naturaleza más hidrofóbica de los ácidos individuales, impurezas nucleícas de cadena (ARN, desnaturalizado ADNc y ADNp desnaturalizado) y endotoxinas para retardar el flujo de estas impurezas a través de un columna de cromatografía con un soporte hidrófobo (por ejemplo, fenilo, octilo), por consiguiente, que el ADN superenrollado se eluye en el flujo a través de la columna (Ghose *et al.*, 2004).Además, HIC necesita una alta concentración de sales para promover la unión, por lo que puede ser más convenientemente empleado después de la cromatografía de intercambio iónico, o cuando el plásmido tiene un alto contenido de sales. A pesar de las capacidades de unión del plásmido a resinas de HIC, el rendimiento obtenido es de hasta un 95% (Diogo *et al.*, 2000). La principal limitación de la técnica es que requiere altas concentraciones de sal (por ejemplo, 1.5 a 2.5 M sulfato de amonio) y ADNp se eluye en tampón de alta concentración de sal. Además, ADNp tiene que ser pre-precipitado a partir del lisado utilizando isopropanol (con limitando la utilización a gran escala), seguido por su solubilización en alta concentración de sal antes de cargarlos en la columna, aumentando el tiempo de operación y los costos (Diogo *et al.*, 2005). Varias patentes han sido emitidas con HIC para la purificación de ADNp (Sousa *et al.*, 2008).

La cromatografía de afinidad

Por último, la captura por afinidad de ADN plasmídico funciona con base a su función biológica o estructura química. Este tipo de herramienta cromatográfica ha sido desarrollado recientemente y está ganando más interés en el mundo académico. Sin

embargo, todavía no existe una literatura ampliamente disponible. En la actualidad se han desarrollado fundamentalmente dos enfoques relevantes para la recuperación de alta afinidad de ADNp:1) Triple hélice, ADN vinculante a proteínas y las interacciones de aminoácidos (Sousa *et al.*, 2008). La afinidad de triple hélice (THAC) se basa en la interacción específica de secuencia de un oligonucleótido pirimidina con ADNp (Wils *et al.*, 1997; Schluep y Cooney, 1998; Prazeres *et al.*, 1998). La unión se produce a través de la surco mayor del ADN y a través de la formación de enlaces de hidrógeno de Hoogsteen. La cinética de unión es generalmente lenta (puede ser necesario > 1h) y requiere un pH ácido con el fin de que el complejo de unión sea estable. A pesar de que esta técnica puede diferenciar el ADNp por su secuencia en un solo paso, los rendimientos de recuperación son bajos (mejor rendimiento ~ 50% (Wils *et al.*, 1997). Sin embargo, se logró un avance significativo en la eliminación de la ADNg, ARN (Tabla 1). La primera demostración de la utilización de proteínas de unión a ADN como ligandos de afinidad en una purificación cromatográfica ADNp fue realizado por Woodgate *et al.*, (2008). Finalmente, la cromatografía de afinidad de amino-ácido de ADN ha sido explorado por el uso histidina (Sousa *et al.*, 2006) o arginina (Sousa *et al.*, 2009) ligandos de aminoácidos (Woodgate *et al.*, 2002). Normalmente se conoce como pseudo ligandos de afinidad, estos dos aminoácidos se han inmovilizado en un soporte de cromatografía y se puede diferenciar entre las isoformas superenrollada (SC) y abierto (SO) ADNp circular se forma en un paso de operación. La eliminación de ADNg y endotoxinas se realizaron dentro de los niveles aceptables y no se encontraron restos de proteínas además no se detectó ARN en la muestra de elución. Sin embargo, estos ligandos han demostrado que tienen rendimientos relativamente bajos y la interacción entre el ADNp y el aminoácido es depende de la composición de la base, lo que puede poner en peligro el futuro de purificación proceso con diferentes plásmidos (Sousa *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Esta revisión describe una amplia gama de soluciones tanto en cepas de *E. coli*, vectores empleados y las operaciones de separación enfrentan la producción de plásmido de ADNp para la terapia génica y vacunas de ADN. Debido a que estas tecnologías evolucionan rápidamente, es probable que continúe un impacto positivo en la forma de producir el ADNp. Sin embargo, existen otro tipo de opciones interesantes para la ingeniería de cepas y vectores que aún no se han abordado. Por ejemplo, una estrategia potencial para el aumento de rendimiento de ADNp es posible que al incrementar el flujo de carbono hacia la vía de las pentosas fosfato sea benéfico para aumentar el contenido específico de ADNp. Esto podría lograrse mediante la

sobreexpresión del gene que codifica para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*zwf*).

Otro factor importante en la producción de ADNp es el número de copias del plásmido se modula utilizando factores externos tales como la temperatura (Carnes *et al*. 2006). En un reciente estudio, Goncalves *et al.,* (2012) señalaron que los resultados publicados por Caspeta *et al.,* (2009) son aplicables a la producción de ADNp con termo inducción, sin embargo es necesario profundizar en este campo de estudio. Lo que sugiere que la termoinducción del ADNp puede ser una herramienta de proceso bastante atractiva, en términos de rendimientos.

En general, los esfuerzos de ingeniería celular y los vectores descritos en esta revisión demuestran la mejora de los procesos que pueden resultar de la evaluación de las tecnologías existentes y la consideración de las preocupaciones del proceso durante la fase de investigación básica de desarrollo de productos. Si bien gran parte de la infraestructura es similar tanto para la proteína recombinante y la producción ADNp, hay muchos temas que son específicos de un producto final de ADN plásmido, y estos temas se han abordado en muchos aspectos originales e innovadores. A medida que nuevas cepas, ingeniería y vectores siguen caracterizándose y ganando una mayor aceptación, la aplicación de estas tecnologías tiene un gran potencial para dar lugar a procesos más productivos en la producción de vacunas de ADNp.

REFERENCIAS

Anderson ED, Mourich DV, Fahrenkrug SC, LaPatra S, Shepherd J & Leong JA (1996) Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 5(2): 114-122.

Bahloul C, Jacob Y, Tordo N & Perrin P (1998) DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssa viruses. *Vaccine* 16(4): 417-425.

Bergman PJ, McKnight J, Novosad A, Charney S, Farrelly J, Craft D, Wulderk M, Jeffers Y, Sadelain M, Hohenhaus AE, Segal N, Gregor P, Engelhorn M, Riviere I, Houghton AN & Wolchokm JD (2003) Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. *Clin. Cancer Res.* 9(4): 1284-1290.

Borja GM, Meza-Mora E, Barron B, Gosset G, Ramirez OT & Lara AR (2012) Engineering *Escherichia coli* to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode. *Microb. Cel.l Fact.* 11: 132.

Bywater M, Bywater R & Hellman L (1983) A novel chromatographic procedure for purification of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 132(1): 219-224.

Carnes AE, Hodgson CP, Luke JM, Vincent JM & Williams JA (2009) Plasmid DNA production combining antibiotic-free

selection, inducible high yield fermentation, and novel autolytic purification. *Biotechnol. Bioeng.* 104(3): 505-515.

Carnes AE, Hodgson CP & Williams JA (2006) Inducible *Escherichia coli* fermentation for increased plasmid DNA production. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 45(Pt 3): 155-166.

Carnes AE, Williams JA & Hodgson CP (2009) Improved *E. coli* plasmid DNA production. *World Patent Application* WO2009025690.

Caspeta L, Flores N, Perez NO, Bolivar F & Ramirez OT (2009) The fffect of heating rate on *Escherichia coli* metabolism, physiological stress, transcriptional response, and production of temperature-induced recombinant protein: a scale-down study. *Biotechnol. Bioeng.* 102(2).

Cooke JR., McKie EA, Ward JM & Keshavarz-Moore E (2004) Impact of intrinsic DNA structure on processing of plasmids for gene therapy and DNA vaccines *J. Biotechnol.* 114(3): 239-254.

Corbeil S, Lapatra SE, Anderson ED, Jones J, Vincent B, Hsu YL & Kurath G (1999) Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout oncorhynchus mykiss using DNA vaccines. *Dis. Aquat. Organ.* 39(1): 29-36.

Cranenburgh RM, Hanak JA, Williams SG & Sherratt DJ (2001) *Escherichia coli* strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration. *Nucleic. Acids. Res.* 29(5): E26.

Chattergoon MA, Kim JJ, Yang JS, Robinson TM, Lee DJ, Dentchev T, Wilson DM, Ayyavoo V & Weiner DB (2000) Targeted antigen delivery to antigen-presenting cells including dendritic cells by engineered Fas-mediated apoptosis. *Nat. Biotechnol.* 18(9): 974-979.

Davis BS, Chang GJ, Cropp B, Roehrig JT, Martin DA, Mitchell CJ, Bowen R & Bunning ML (2001) West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Virol.* 75(9): 4040-4047.

De Anda R, Lara AR, Hernandez V, Hernandez-Montalvo V, Gosset G, Bolivar F & Ramirez OT (2006) Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metab. Eng.* 8(3): 281-290.

Deck RR, DeWitt CM, Donnelly JJ, Liu MA & Ulmer JB (1997) Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. *Vaccine* 15(1): 71-78.

Diogo MM, Queiroz JA, Monteiro GA, Martins SA, Ferreira GN & Prazeres DM (2000)

Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnol. Bioeng.* 68(5): 576-583.

Diogo MM, Queiroz JA, Monteiro GA & Prazeres DM (1999) Separation and analysis of plasmid denatured forms using hydrophobic interaction chromatography. *Anal. Biochem.* 275(1): 122-124.

Diogo MM, Queiroz JA & Prazeres DM (2005) Chromatography of plasmid DNA. *J. Chromatogr. A* 1069(1): 3-22.

Donnelly J, Berry K & Ulmer JB (2003) Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines. *Int. J. Parasitol.* 33(5-6): 457-467.

Donnelly JJ, Ulmer JB & Liu MA (1994) Immunization with DNA. *J. Immunol. Methods* 176(2): 145-152.

Donnelly JJ, Ulmer JB & Liu MA (1997) DNA vaccines. *Life. Sci.* 60(3): 163-172.

Durfee. T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G, Burland V, Mau B, Petrosino JF, Qin X, Muzny DM, Ayele M, Gibbs RA, Csorgo B, Posfai G, Weinstock GM & Blattner FR (2008) The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B insights into the biology of a laboratory workhorse. *J. Bacteriol.* 190(7): 2597-2606.

FDA (2007) Guidance for industry: considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications. *US Food and Drug Administration*.

Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA & Bolivar F (2002) Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by $^{(13)}C$ labeling and NMR spectroscopy. *Metab. Eng.* 4(2): 124-137.

Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC & Robinson HL (1993) DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90(24): 11478-11482.

Ghose S, Forde GM & Slater NK (2004) Affinity adsorption of plasmid DNA. *Biotechnol. Prog.* 20(3): 841-850.

Holmes ML, Pfeifer F & Dyall-Smith ML (1995) Analysis of the halobacterial plasmid pHK2 minimal replicon. *Gene* 153(1): 117-121.

Horn NA, Meek JA, Budahazi G & Marquet M (1995) Cancer gene therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials. *Hum. Gene. Ther.* 6(5): 565-573.

Huber H, Pacher C, Necina R, Kollmann F & Reinisch C (2005) Method for producing plasmid DNA on a manufacturing scale by fermentation of the *Escherichia coli* K-12 strain JM108. In *World Patent Application.* Vol. WO2005098002.

Khan AS, Bodles-Brakhop AM, Fiorotto ML & Draghia-Akli R (2010) Effects of maternal plasmid GHRH treatment on offspring growth. *Vaccine* 28(8): 1905-1910.

Kilpatrick AM, Dupuis AP, Chang GJ & Kramer LD (2010) DNA vaccination of American robins (*Turdus migratorius*)

against West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic. Dis.* 10(4): 377-380.

Kim TW, Hung CF, Zheng M, Boyd DA, He L, Pai SI & Wu TC (2004) A DNA vaccine co-expressing antigen and an anti-apoptotic molecule further enhances the antigen-specific $CD8^+$ T-cell immune response. *J. Biomed. Sci.* 11(4): 493-499.

Knabben I, Regestein L, Marquering F, Steinbusch S, Lara AR & Buchs J (2010) High cell-density processes in batch mode of a genetically engineered *Escherichia coli* strain with minimized overflow metabolism using a pressurized bioreactor. *J. Biotechnol.* 150(1): 73-79.

Kutzler MA & Weiner DB (2008) DNA vaccines: ready for prime time? *Nat. Rev. Genet.* 9(10): 776-788.

Lahijani R, Hulley G, Soriano G, Horn NA & Marquet M (1996) High-yield production of pBR322-derived plasmids intended for human gene therapy by employing a temperature-controllable point mutation. *Hum. Gene. Ther.* 7(16): 1971-1980.

Lara AR (2011) Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 10(2): 209-223.

Lara AR, Ramirez OT & Wunderlich M (2012) Plasmid DNA production for therapeutic applications. *Methods. Mol. Biol.* 824: 271-303.

Lara AR, Taymaz-Nikerel H, Mashego MR, van Gulik, WM, Heijnen JJ, Ramirez OT & van Winden WA (2009) Fast dynamic response of the fermentative metabolism of *Escherichia coli* to aerobic and anaerobic glucose pulses. *Biotechnol. Bioeng.* 104(6): 1153-1161.

Lee SW, Cho JH, Lee KJ & Sung YC (1998) Hepatitis C virus envelope DNA-based immunization elicits humoral and cellular immune responses. *Mol. Cells.* 8(4): 444-451.

Li LZ, Liu Y, Sun MS & Shao YM (2007) Effect of salt on purification of plasmid DNA using size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A* 1139(2): 228-235.

Liao JC, Gregor P, Wolchok JD, Orlandi F, Craft D, Leung C, Houghton AN & Bergman PJ (2006) Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer. Immun.* 6: 8.

Lin-Chao S, Chen WT & Wong TT (1992) High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Mol. Microbiol.* 6(22): 3385-3393.

Lipps G (2008) Plasmids: Current Research and Future Trends. *Caister Academic Press.*

Listner K, Bentley L, Okonkowski J, Kistler C, Wnek R, Caparoni A, Junker B, Robinson D, Salmon P & Chartrain M (2006) Development of a highly productive and scalable plasmid DNA production platform. *Biotechnol. Prog.* 22(5): 1335-1345.

Liu MA (2011) DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol. Rev.* 239(1): 62-84.

Liu MA, McClements W, Ulmer JB, Shiver J & Donnelly J (1997) Immunization of non-human primates with DNA vaccines. *Vaccine* 15(8): 909-912.

Lorenzen N, Olesen NJ & Jorgensen PE (1990) Neutralization of Egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral G protein. *J. Gen. Virol.* 71 (Pt 3): 561-567.

Miki T, Yasukochi T, Nagatani H, Furuno M, Orita T, Yamada H, Imoto T & Horiuchi T, (1987) Construction of a plasmid vector for the regulatable high-level expression of eucaryotic genes in *Escherichia coli* an application to overproduction of chicken lysozyme. *Prot. Eng.* 1(4): 327-332.

O'Kennedy RD, Baldwin C & Keshavarz-Moore E (2000) Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps. *J. Biotechnol.* 76(2-3): 175-183.

Okonkowski J, Kizer-Bentley L, Listner K, Robinson D & Chartrain M (2005) Development of a robust, versatile, and scalable inoculum train for the production of a DNA vaccine. *Biotechnol. Prog.* 21(4): 1038-1047.

Ouyang L, Yi X, Zeng X, Zhou J, Wang Q & McReynolds L (2003) Partial protection induced by phage library-selected peptides mimicking epitopes of *Schistosoma japonicum*. *Chin. Med. J. (Engl)* 116(1): 138-141.

Pablos TE, Soto R, Meza E, Le Borgne S, Gosset G, Ramírez OT & Lara AR (2012) Enhanced production plasmid DNA by engineered *Escherichia coli* strains. *J. Biotechnol.* 158: 211-214.

Phue JN, Lee SJ, Trinh L & Shiloach J (2008) Modified *Escherichia coli* B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with *Escherichia coli* K (DH5alpha). *Biotechnol. Bioeng.* 101(4): 831-836.

Phue JN, Noronha SB, Hattacharyya R, Wolfe AJ & Shiloach J (2005) Glucose metabolism at high density growth of *E. coli* B and *E. coli* K: differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in *E. coli* B as determined by microarrays and Northern blot analyses. *Biotechnol. Bioeng.* 90(7): 805-820.

Prazeres DM, Ferreira GN, Monteiro GA, Cooney CL & Cabral JM (1999) Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. *Trends. Biotechnol.* 17(4): 169-174.

Prazeres DM, Schluep T & Cooney C (1998) Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* 806(1): 31-45.

Prud'homme GJ (2005) DNA vaccination against tumors. *J. Gene. Med.* 7(1): 3-17.

Przybycien TM, Pujar NS & Steele LM (2004) Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15(5): 469-478.

Rozkov A, Avignone-Rossa CA, Ertl PF, Jones P, O'Kennedy RD, Smith JJ, Dale

JW & Bushell ME (2004) Characterization of the metabolic burden on *Escherichia coli* DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence. *Biotechnol. Bioeng.* 88(7): 909-915.

Schluep T & Cooney CL (1998) Purification of plasmids by triplex affinity interaction. *Nucleic. Acids. Res.* 26(19): 4524-4528.

Shabaan AM, Mohamed MM, Abdallah MS, Ibrahim HM & Karim AM (2003) Cloning and characterization of a *Schistosoma mansoni* 1H and 30S clones as two tegumental vaccine candidate antigens. *Acta. Biochim. Pol.* 50(1): 269-278.

Singer A, Eiteman MA & Altman E (2009) DNA plasmid production in different host strains of *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36(4): 521-530.

Soto R, Caspeta L, Barrón BL, Gosset G, Ramírez OT & Lara AR (2011) High cell-density cultivation in batch mode for plasmid DNA vaccine production by a metabolically engineered *E. coli* strain with minimized overflow metabolism. *Biochem. Eng. J.* 56(3): 165-171.

Soubrier F, Laborderie B & Cameron B (2005) Improvement of pCOR plasmid copy number for pharmaceutical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66(6): 683-688.

Sousa F, Freitas S, Azzoni AR, Prazeres DM & Queiroz J (2006) Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 45(Pt 3): 131-140.

Sousa F, Prazeres DM & Queiroz JA (2008) Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. *Trends Biotechnol.* 26(9): 518-525.

Sousa F, Prazeres DM & Queiroz JA (2009) Binding and elution strategy for improved performance of arginine affinity chromatography in supercoiled plasmid DNA purification. *Biomed. Chromatogr.* 23(2): 160-165.

Stadler J, Lemmens R & Nyhammar T (2004) Plasmid DNA purification. *J. Gene. Med.* 6 Suppl 1: S54-66.

Trindade IP, Diogo MM, Prazeres DM & Marcos JC (2005) Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* 1082(2): 176-184.

Vandermeulen G, Marie C, Scherman D & Preat V (2011) New generation of plasmid backbones devoid of antibiotic resistance marker for gene therapy trials. *Mol. Ther.* 19(11): 1942-1949.

Wang Z, Le GW, Shi YH & Wegrzyn G (2001) Medium design for plasmid DNA production based on stoichiometric model. *Process Biochem.* 36: 1085–1093.

WHO (2007) Annex 1: Guidelines for assuring the quality and nonclinical safety evaluation of DNA vaccines. *World Heath Organization Technical Report Series* No 941.

Wicks IP, Howell ML, Hancock T, Kohsaka H, Olee T & Carson DA (1995) Bacterial lipopolysaccharide copurifies with plasmid DNA: implications for animal models and human gene therapy. *Hum. Gene. Ther.* 6(3): 317-323.

Wils P, Escriou V, Warnery A, Lacroix F, Lagneaux D, Ollivier M, Crouzet J, Mayaux JF & Scherman D (1997) Efficient purification of plasmid DNA for gene transfer using triple-helix affinity chromatography. *Gene. Ther.* 4(4): 323-330.

Williams JA, Carnes AE & Hodgson CP (2009) Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol. Adv.* 27(4): 353-370.

Woodgate J, Palfrey D, Nagel DA, Hine AV & SlaterNK (2002) Protein-mediated isolation of plasmid DNA by a zinc finger-glutathione S-transferase affinity linker. *Biotechnol. Bioeng.* 79(4): 450-456.

Yau SY, Keshavarz-Moore E & Ward J (2008) Host strain influences on supercoiled plasmid DNA production in *Escherichia coli*: Implications for efficient design of large-scale processes. *Biotechnol. Bioeng.* 101(3): 529-544.

Yi Y, Hahm SH & Lee KH (2005) Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions. *Curr. Gene. Ther.* 5(1): 25-35.

Yokoyama M, Zhang J & Whitton JL (1995) DNA immunization confers protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Virol.* 69(4): 2684-2688.



www.smbb.com.mx