

REVISTA de la Sociedad Mexicana de

BIO TECNOLOGIA

y Bioingeniería A.C.



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

Nueva Era.
Volúmen 11, Número 2
Año 2007

ISSN-0188-47-86

REVISTA de la Sociedad Mexicana de
BIO TECNOLOGIA
y Bioingeniería, A.C.

MESA DIRECTIVA

Dra. Amelia Farrés González Sarabia
Presidente

Dra. María Luisa Villarreal Ortega
VicePresidenta

Dra. Judith Jiménez Guzmán
Secretaria

Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano
Tesorera

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
Subsecretaria

Dr. Marco Rito Palomares
Vocal

I.A. Alaide Jiménez Serna
Vocal Estudiante

COMITÉ EDITORIAL

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

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
CINVESTAV, IPN.

Dr. Fernando Luis García Carreño
CIBNOR, S.C.

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
UAM, Iztapalapa

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Sara Solís Pereira
Instituto Tecnológico de Mérida

SUSCRIPCIONES Y PUBLICIDAD

Lic. Elydeé Cardeña Medina
Tel./ Fax (01 55) 5849 5859
smbiotec@yahoo.com.mx

FORMACIÓN EDITORIAL Y DISEÑO GRÁFICO

Lic. Elydeé Cardeña Medina

COORDINADOR EDITORIAL

Lic. Elydeé Cardeña Medina

BioTecnología

ISSN0188-476, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, Índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias

(CIC-UNAM). Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1999-082518285000-101. Los Conceptos que en éllo aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Del. Tlalpan, México, D.F. Tiraje 500 ejemplares.

La **Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC (SMBB)**, me ha solicitado tomar la estafeta de la Revista **BioTecnología**, órgano de difusión de nuestra Sociedad. La acepto con gran gusto, reconociendo el trabajo realizado por los doctores **Mayra de la Torre Martínez, Octavio Loera Corral, y Gustavo Viniegra González**, quienes me precedieron en esta importante tarea en el período anterior. Es mi propósito el tratar de mantener ese espíritu, motivación, compromiso y calidad de trabajo que mostraron durante el tiempo de su participación.

BioTecnología representa uno de los foros de difusión más importantes con que cuenta la **SMBB**. Desde luego que su publicación no resulta una tarea fácil y depende de la participación generosa de un buen número de personas. Con el fin de armonizar la Revista con otras similares de difusión nacional e internacional, he solicitado y conseguido de la Directiva de nuestra Sociedad, su aprobación para llevar a cabo una serie de cambios en el formato de la misma. Estoy convencido de que estos cambios la tornarán mas atractiva y alentarán a los miembros de la comunidad biotecnológica del país, a publicar en ella sus trabajos de investigación y de difusión en sus respectivas áreas de especialización. El nuevo formato de la Revista ya se encuentra para su consulta en la página de la **SMBB**. Bajo estas nuevas condiciones, la Revista **BioTecnología** demanda una vez más del apoyo de su comunidad para lograr consolidarse, a través de someter sus trabajos a la misma. Adicionalmente y con el fin de agilizar la rapidez de la publicación, se ha conseguido que los trabajos aceptados aparezcan inicialmente on-line, en la página de la **SMBB**.

Para la tarea que se nos presenta, he invitado a participar a los doctores **Luís Bernardo Flores Cotera** del CINVESTAV en México D.F., **Fernando Luís García Carreño** del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste SC, en La Paz, BCS., **Mariano Gutiérrez Rojas** de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa en México, D.F., **Romina Rodríguez Sanoja** del Instituto de investigaciones Biomédicas de la UNAM, en México D.F., así como de **Sara Solís Pereira** del Instituto Tecnológico de Mérida, en Mérida Yuc. Mi profundo agradecimiento a este gran equipo de trabajo al haber aceptado formar parte del Comité Editorial de la Revista. Sin duda, la participación de tan distinguidos miembros de nuestra comunidad, enriquecerá los alcances, calidad e impacto de la Revista y con ello, colaborarán a cumplir cabalmente con los objetivos que sustentan y engrandecen a la **Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC**.

Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Editor en Jefe de la Revista **BioTecnología**

BioTecnología-2007

Instrucciones para los autores

Guía de Autores

La revista puede recibir trabajos de revisión así como de investigación original 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.

El idioma oficial de la revista es el Español, pero en casos especiales se podrán recibir contribuciones en 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 entre 5 y 15 páginas (de 1000 a 4000 palabras) 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.

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. Aplicaciones de la Biotecnología para resolver problemas o atender necesidades de la sociedad, con especial atención a sus aplicaciones ya vigentes en México. Esta sección será dedicada a una empresa o institución (pública o privada) que desee difundir los logros obtenidos en algún campo de la biotecnología. Por ejemplo: empresas productoras de antibióticos o productos biológicos, empresas de ingeniería ambiental que usen procesos biotecnológicos, empresas agropecuarias, forestales o de acuicultura que usen tecnologías biológicas avanzadas, o empresas de transformación de alimentos que utilicen enzimas, cultivos de microorganismos, etc. Esta lista es indicativa pero no exhaustiva.
3. 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.
4. 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

BioTecnología-2007

Instrucciones para los autores

general, el análisis de necesidades, métodos y alternativas para difundir los conocimientos de la biotecnología.

5. Las fronteras de la biotecnología: revisiones de nuevos campos o nuevas aplicaciones de la biotecnología para resolver problemas de las sociedades. Por ejemplo: las perspectivas del uso del genoma humano para el desarrollo de nuevas drogas. Las perspectivas de la genómica (estudio sistemático e informático de los genes), 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. Los nuevos esquemas de reacción, separación y control en procesos biotecnológicos.
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 cabida 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.

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 ser combinadas.

Tanto las revisiones como los trabajos originales deberán apearse 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 correspondiente.
3. Se deberá añadir un RESUMEN de no más de 250 palabras en Español y un ABSTRACT en Inglés.
4. Se incluirán entre 3 a 6 **Palabras clave**: que permitan clasificar el artículo en una base de datos. Estas palabras deberán de incluirse en Español y en Inglés (**Key words**:).

Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste se pondrá como primera línea en **negritas** con letra Arial o equivalente tamaño **10**. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o

BioTecnología-2007

Instrucciones para los autores

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.

- 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.
- La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a tal fuente de información, si ello fuera necesario. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: "Martínez & García (1999) han demostrado que...", o bien, "Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...". Si la cita posee varios autores se escribiera como sigue: "Gutiérrez *et al.* (2003), han demostrado..." O bien: "Datos recientes (Gutiérrez *et al.*, 2003) han mostrado..." Si la cita es 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:

Playne MJ & Crittenden RG (1999) Technology aspects related to food microbiology. *Food Technol.* 52: 67-75.

Para libros:

Armstrong DW, Brown LA, Porter S & Rutten R (1993) Biotechnological derivation of aromatic flavour compounds and precursors. *In: Progress in flavour precursor studies.* Schreier P & Winterhalter P (eds). Allured, Carol Stream, Ill., pp. 425-438.

Box GEP, Hunter WG & Hunter JS (1978) *Statistics for experimenters.* John Wiley & Sons, New York.

Para patentes:

Dasek J, Shepherd D & Traelnes RK (1973) Procéde de fabrication de zeaxanthine. Belgium Patent 790289.

Para congresos y reuniones:

Jorge H, González, R, Jorge I, Almeida R & Santana I (2001) Impacto del programa de mejoramiento de La caña de azúcar en Cuba. *IV Seminario Internacional de Sanidad Vegetal, Varadero, Cuba*, pp. 11.

Para tesis de pre y posgrado:

Jiménez (1995). Jiménez E. 1995. Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).

BioTecnología-2007

Instrucciones para los autores

híbrido). Tesis de grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara, pp. 93.

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

Los autores deberán acompañar su manuscrito de una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería podrá 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 correspondiente, 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/menu3/prem_hus.htm. La publicación en línea precederá a la publicación impresa.

Detección de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* en Caña de Azúcar (*Saccharum* spp.), Saneamiento Mediante Técnicas Biotecnológicas.

Dagoberto Guillen¹, Ricardo Hernández², Lisbet Rodríguez³ y Rafael Gómez⁴.

¹Campus Oriente, Univ. Autónoma del estado de Morelos. México. E-mail: dagoguillen@yahoo.com; ²CETAS. Universidad de Cienfuegos, Cuba. E-mail: santaclara57@yahoo.es. ³Estación Experimental de la Caña de Azúcar (EPICA), Ranchuelo, VC, Cuba. ⁴Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), UCLV, Cuba

Palabras clave: Caña de azúcar (*Saccharum* spp.), *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, diagnóstico, saneamiento, plantas sanas, RSD.

Key words: Sugar cane (*Saccharum* spp.), *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, diagnosis, free plants, healthy plants, RSD.

RESUMEN

El raquitismo de los retoños (RSD), enfermedad producida por la bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, es una de las más generalizadas en las plantaciones cañeras cubanas y ocasiona notables pérdidas en el rendimiento agrícola. Una de las formas de combatirla es el tratamiento de la semilla para eliminar la bacteria del tejido, para lo cual se requiere de técnicas de saneamiento y un diagnóstico preciso para su detección, sobre todo como base para la producción de semilla por técnicas de propagación masiva. Este trabajo tuvo como objetivo el empleo de una técnica de diagnóstico sensible y masiva como el dot-blot, que permitió detectar la presencia del agente causal del RSD en materiales micropropagados por diferentes técnicas de saneamiento aplicadas para el control de dicho agente. Los resultados demuestran que la termoterapia y el cultivo de ápices meristemáticos, por sí solos, resultan ineficientes para la eliminación de este patógeno. Sin embargo, el uso de la electroterapia combinada con el cultivo de meristemo mostró posibilidades reales de obtener plantas sanas del 84-100% en Ja 60-5 y de un 25-80% en CP 52-43 utilizando (10, 15, 30 V por 5 min). El diagnóstico por dot-blot con un anticuerpo monoclonal de producción nacional en la detección de *L. xyli* subsp. *xyli*, con centrifugación de las muestras, previa a la colocación en la membrana de nitrocelulosa, resulta ser un protocolo adecuado para el análisis de un gran número de muestras que provienen de campo o que han sido tratadas durante el saneamiento.

ABSTRACT

The Ratoon stunting disease (RSD), due to the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, is one of the most generalized diseases in the Cuban sugar cane plantations, where a significant yield loss occurs. One of the ways to attack this disease is to treat the seeds for eliminating bacteria from tissues and therefore, cleaning techniques and a precise diagnostic for its detection are needed. There is a need to do it as a base for seed production through mass propagation techniques. The main objective of this work was to use a mass and sensitive diagnostic technique like dot-blot that permitted to detect the causal agent of this disease from materials micropropagated through different cleaning techniques applied to control such agent. Results showed that thermotherapy and apical meristem culture are not enough by itself for eliminating this pathogen. However, the combined use of electrotherapy with meristem culture showed real possibilities of obtaining healthy plants; that is, from 84 to 100% in Ja 00-5 and from 25 to 80% in CP 52-43 using 10, 15, 30 V per 5 min. The diagnostic by dot-blot using a monoclonal antibody of national production for detection of *L. xyli* subsp. *xyli*, through centrifugation of samples, before placing them in nitrocellulose membranes resulted to be a suitable protocol for analyzing a great number of samples from field conditions or samples treated for cleaning.

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es el principal cultivo económico de muchos países. Se encuentra entre los diez primeros para la producción de alimento y proporciona entre el 60 y 70% del azúcar que se elabora mundialmente (Ahlfeld, 1996). Su cultivo en Cuba ocupa una superficie de 1.6 millones de ha, que representa el 27% de la tierra cultivable del país.

Las enfermedades de la caña de azúcar constituyen uno de los principales factores negativos para la producción azucarera mundial. Durante los últimos años ha crecido considerablemente el número de organismos patógenos y agentes etiológicos detectados sobre este cultivo y se han extendido, de forma notable, los que existían con anterioridad. Hasta la fecha han sido informadas más de 126 enfermedades en unos 109 países y regiones cañeras. Por tal motivo, es de suma importancia dominar la situación fitosanitaria de las plantaciones cañeras para estar en condiciones de prevenir o reducir las pérdidas ocasionadas por enfermedades en las cosechas (Chinea *et al.*, 2000).

El raquitismo de los retoños (RSD), una de las enfermedades más difundidas por las regiones cañeras del mundo, ocasiona cuantiosas pérdidas al cultivo de la caña de azúcar al reducir los rendimientos agrícolas hasta un 15-20% en caña planta; siendo mayores los deterioros en los retoños sucesivos. Por sus características aparentemente asintomáticas y su fácil forma de propagación, ha alcanzado una diseminación generalizada en las plantaciones cañeras de Cuba, que incluye todas las categorías de semilla certificada. Se estima además que la declinación, deterioro o rechazo de muchas variedades importantes ha tenido su origen en el raquitismo, con lo cual muchos años de trabajo pueden ser destruidos en un período de tiempo relativamente corto por esta enfermedad, cuyo agente causal es la bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. (Martín *et al.*, 2001).

Young *et al.* (2006) informan que el RSD es una de las enfermedades más difundidas en las regiones cañeras produciendo pérdidas superiores al 30%. La enfermedad es diseminada mecánicamente en los plantines pese al uso de termoterapia de los donantes. Dicha terapia reduce la incidencia, pero no erradica el agente. Por lo que aseguran que el uso de cultivares resistentes ofrecería las mayores posibilidades de manejo de la enfermedad.

Por otra parte (Gillaspie & Teakle, 1989) infieren que su control depende fundamentalmente del uso de semilla sana, utilizando para ello el tratamiento térmico de la semilla y el saneamiento por cultivo de meristemas. Sin embargo, la efectividad de ambos es variable y en ocasiones insuficiente, por tal razón (Peralta *et al.*, 1997), plantean la importancia del diagnóstico eficaz de las líneas que se obtengan, para garantizar una certificación del material de siembra saneado. Durante muchos años, el diagnóstico de esta enfermedad estuvo basado fundamentalmente en la observación de síntomas visibles en plantas indicadoras y el empleo de la microscopía electrónica, que sin duda hizo posible precisar la ubicación taxonómica de la bacteria, observar su posición en los haces vasculares de las plantas infectadas y su presencia en los vasos del metaxilema.

En la actualidad, sin minimizar la importancia de estos métodos convencionales de detección y conociendo la naturaleza fastidiosa de la fitobacteria que la produce, se hace necesario implementar y validar métodos más sensibles, rápidos y confiables que permitan detectar tempranamente la presencia del agente causal de la enfermedad a partir del jugo de la caña, sin necesidad de realizar el cultivo de la bacteria que tarda alrededor de 17-20 días aproximadamente (Peralta *et al.*, 1997). Para ello se han venido empleando ensayos inmunoenzimáticos (dot-blot), muy confiables en la detección de pequeñas concentraciones de antígenos proteicos con una metodología adecuada, de bajo costo y fácil utilización.

Teniendo en cuenta lo antes expuesto, fue necesario evaluar el empleo de otras técnicas de

saneamiento para eliminar la bacteria con la implementación de un diagnóstico confiable y de alta sensibilidad, que posibilite la certificación segura de las líneas obtenidas durante los diferentes procesos biotecnológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento empleado para la detección de Leifsonia xyli subsp. xyli mediante dot-blot

Se tomaron unas 100 muestras de plantas caña de azúcar variedad Ja 60-5 procedentes del Banco de Semilla de Ifraín Alfonso, Municipio Ranchuelo, VC (Cuba), a las que se analizó para detectar el agente causal del raquitismo de los retoños (RSD), a través de técnica de dot-blot, utilizando ascitis (AcM para *L. xyli* subsp. *xyli*), conjugado anti-IgG de ratón con fosfatasa alcalina, en membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm, con controles positivos liofilizados y extracto de tallos, control negativo de material vegetal *in vitro* de papa y como sustrato el nitroblue tetrazolium (NTB) y el 5 bromo 4 chloro 3 indolyl fosfato (BCIP). Las diluciones de trabajo fueron: anticuerpo monoclonal (ascitis): 1:10 en TBS + BSA 2%, conjugado F Alcalina: 1: 500 en TBS + BSA 2% y muestras puras (extractos de tallos directamente). Para el análisis se siguió el protocolo descrito por el CEMSA (1994).

Las muestras fueron jugo de caña extraídas con una pinza a presión, dividiéndose en alícuotas para ser almacenadas a -20°C. En este caso se hicieron modificaciones al protocolo original en la etapa de preparación de la muestra, adicionando un paso de clarificación del jugo por centrifugación a 15,000 rpm en centrífuga Eppendorf, para lograr eliminar la oxidación de la savia extraída y manchado de la membrana de nitrocelulosa.

Técnica de saneamiento de plantas enfermas procedentes del banco de semilla.

A las plantas diagnosticadas como positivas a RSD se les extrajeron los spindles para su multiplicación *in vitro* mediante cultivo de ápices y las yemas del tallo fueron sometidas a diferentes

tratamientos de termoterapia en agua caliente y aire caliente según se describe a continuación.

1. Saneamiento por cultivo de ápices meristemáticos.

De cada yema (spindles) sero positiva se extrajeron los meristemas de 0.5-0.7 mm y se sembraron en medio de establecimiento (Fig. 1). Se utilizaron tubos de ensaye (145 mm x 25 mm) con 10-ml de medio de cultivo. Los meristemas se mantuvieron en oscuridad en la primera semana para reducir la fenolización y luego, pasados a condiciones de iluminación solar durante cuatro semanas. Seguidamente se pasaron a fase de multiplicación donde los explantes fueron colocados en recipientes plásticos de 600-ml de capacidad con 70 ml de medio y 10 explantes por frasco. Se realizaron 3 subcultivos cada 21 días y posteriormente se pasaron a fase de enraizamiento y aclimatización. Las vitroplantas aclimatizadas se trasladaron a la Estación Territorial de la Caña de Azúcar (ETICA) para culminar su desarrollo.

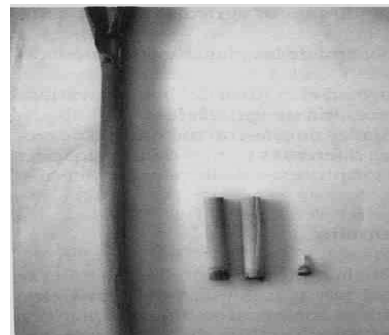


Fig. 1. Spindles o cogollo de caña de azúcar mondado y reducido a un ápice para luego ser tratado con una terapia.

Los medios utilizados para las tres fases de la micropropagación fueron los propuestos por Jiménez *et al.* (1997), con una intensidad lumínica de 2000 lux y una temperatura de 26 ± 2°C. Cuando creció el primer canuto se le efectuó el diagnóstico siguiendo el procedimiento ya descrito, pero cada muestra extraída se dividió en dos alícuotas y a una de ellas se le dio un golpe de centrifuga Eppendorf a 15,000 rpm.

2. Saneamiento por termoterapia

Se tomaron yemas de planta las que se dividieron en tres grupos aplicándosele los tratamientos siguientes:

Variante 1: Agua caliente a 50.5°C por dos horas = 50 yemas.

Variante 2: Agua caliente a 50.5°C por tres horas a dos yemas por planta = 50 yemas.

Variante 3: Cámara húmeda a 44°C durante cuatro horas y seguidamente a 25°C por cuatro horas más a yemas por planta = 50 yemas.

Una vez concluidos estos tratamientos se sembraron las yemas en cajas de poliespuma con suelo estéril para llevarlas a la ETICA, donde culminaron su desarrollo. Cuando crecieron se diagnosticaron, también por el procedimiento descrito.

3. Electroterapia y cultivo de ápices

Los tratamientos eléctricos fueron aplicados a partir de una fuente de corriente directa construida para el efecto (Hernández *et al.*, 1995) (Fig. 2). Se midió la corriente eléctrica de salida en (miliamperes) y el voltaje aplicado (volt). Se trabajó con dos variedades de caña de azúcar (Ja 60-5 y CP 52-43), estudiándose tres tratamientos de voltajes constantes de 30, 15, 10 volts por 5 min, se incluyó un testigo sin tratar y se hicieron 30 replicas por cada variante. El procedimiento *in vitro* se efectuó según el método tradicional de extracción de meristemas. Posterior a la aplicación de corriente se establecieron 50 ápices/tratamiento con aproximadamente 0.7 cm de longitud en el medio de cultivo propuesto por Santana (1994) y luego se multiplicaron según Jiménez (1995). En experimentos previos se delimitó la sensibilidad de la corriente al tejido y se seleccionó qué parte de la planta sería tratada, así como que plantas debían proceder de campo o vitroplantas adaptadas a condiciones controladas con más de tres meses de transplante.

A los 30 días se evaluó el porcentaje de regeneración y después del primer subcultivo se

tomaron 5 replicas de cada línea para el diagnóstico. Las copias de estas muestras negativas fueron enviadas al CENSA para su reconfirmación. Los resultados obtenidos fueron procesados mediante el análisis de comparación de proporciones que brinda el paquete estadístico STATGRAPHICS para Windows versión 4.1 con un nivel de significación del 95%.



Fig. 2. Equipo de Electroterapia para la aplicación de corriente. Reg. Patent. 37/95 AO.1C/08 Res.1524/97. OPIC. Cuba.

4. Diagnóstico de material obtenido por diferentes técnicas biotecnológicas.

a. Material proveniente de embriogénesis somática

Para ello se tomaron plantas (6 meses) de la variedad C87-82 obtenidas en el IBP por embriogénesis somática (según metodología de Freire, 2001), extrayéndose el jugo que fue dividido en dos alícuotas de ellas una se le dio un golpe de centrifuga Eppendorf a 15,000 rpm y la otra sin centrifugar, con ambas se siguió el procedimiento de dot-blot antes mencionado.

b. Material proveniente de organogénesis indirecta

Unas 100 plantas con (6 meses) de sembradas, variedad Ja 60-5 obtenidas por organogénesis indirecta según la metodología de Gómez (1996) desarrolladas en el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central de Las Villas, Cuba, se diagnosticaron con igual procedimiento

que el anterior.

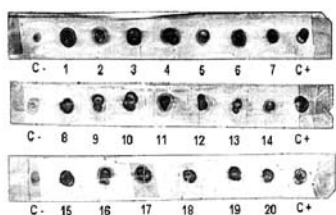
c. Material proveniente de cultivo de meristemos

La última vía a diagnosticar fueron vitroplantas obtenidas exclusivamente por cultivo de meristemos extraídas con un tamaño inferior a 0.4 mm, de los somaclones UCLV- Ja89-179 y UCLV-POJ89-112, según la metodología de Jiménez *et al.* (1997). En este caso se analizaron las líneas regeneradas *in vitro*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diagnóstico y saneamiento de las plantas procedentes del banco de semilla

En el procedimiento empleado al aplicar la técnica de dot-blot a diferentes muestras de campo, pudimos evaluar que la misma detectó en un 100% muestras positivas a RSD, o sea, todas las plantas estaban enfermas (Fig. 3); lo cual coincide con lo expuesto por Damann (1992). Este plantea que esta enfermedad está muy generalizada en la producción e incluso en áreas de bancos de semilla por lo que se proponen diferentes estrategias con el fin de atenuar la presencia de esta bacteria y su temprana detección para disminuir pérdidas en los rendimientos.



Leyenda:
1-20 : Muestras
C+ : Control Positivo.
C- : Control Negativo

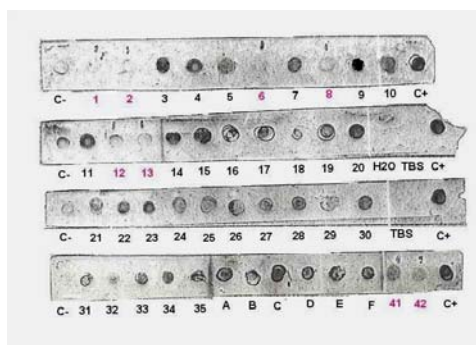
Fig. 3. Resultado del diagnóstico por dot-Blot hecho preliminarmente a las muestras del banco de semilla.

El empleo del cultivo de ápices meristemáticos es una técnica ya establecida para la micropropagación de la caña de azúcar, sin embargo, existen pocas referencias en la literatura de su uso como método de saneamiento a RSD. De los ápices sembrados se obtuvieron plantas regeneradas en un 30% (Fig. 4).



Fig. 4. Plantas obtenidas por cultivo de ápices meristemáticos y regeneradas en tubos de ensayo.

Como se muestra en la Fig. 5, en el diagnóstico a RSD, todas resultaron positivas para un 100% de muestras enfermas (muestras de la A-F). Los resultados obtenidos muestran que el cultivo de ápices meristemáticos no es suficiente para la eliminación de este patógeno.



Leyenda:
1-13 = Muest. Embriog. un golpe de centrifuga (tiras 1 y 2)
14-35 = Muest. Organog. un golpe de centrifuga (tiras 2, 3 y 4)
41-42 = Muest. Cult. de Merist. Centrif. A 15,000 rpm 20 min (tira 4)
A-F = Muest. Cult. de ápices un golpe de centrifuga (tira 4)
TBS = Solución de TBS

Fig. 5. Resultado del dot-blot en las muestras procedentes del cultivo *in vitro*

Similares resultados obtuvieron Peteira *et al.* (1992) quienes alcanzaron de un 96-100% de saneamiento al combinar el cultivo de ápices con termoterapia (50 °C durante 10 minutos) y quimioterapia (ácido giberélico 0.5 mg/L). La utilización de sistemas mixtos no solo ha logrado la eliminación del RSD sino también de otros patógenos de la caña de azúcar como los

causantes de la escaldadura foliar y el VMCA (Sordi & Tokeshi, 1988 y Matos, 2002). Aunque en nuestro caso el cultivo de ápices no resultó un método efectivo para el saneamiento a RSD si existen evidencias de que esta técnica ha tenido buenos resultados en la eliminación de virus y bacterias tanto en caña como en otros cultivos.

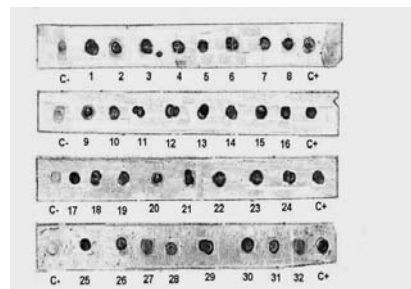
Es de destacar que los resultados fueron mejor observados en las muestras sometidas a un golpe de centrifuga, considerándose que de esta forma se eliminan los fenoles y no se mancha la membrana, lo cual coincide con resultados de Martínez *et al.* (1994) al usar similares protocolos en la técnica de dot-blot con centrifugación de las muestras antes de aplicarlas sobre la membrana de nitrocelulosa.

Saneamiento por termoterapia

Ante los tratamientos térmicos efectuados a las yemas, los resultados de regeneración en el tratamiento con agua caliente a 50.5 °C por tres horas fue de 0%, ya que al afectarse su germinación no se logró obtener ninguna planta y en el resto de los tratamientos fue de un 40% al obtenerse 16 plantas de las 40 yemas sembradas. Esta brotación es baja y coincide con los reportados en la literatura para tratamientos largos, dado que a medida que aumenta la temperatura disminuye la emergencia de yemas, así como la supervivencia de las plantas. Fitch *et al.* (2001) aclaran que los tratamientos con agua caliente no fueron satisfactorios para eliminar el virus, además de solo regenerar el 50% de las plantas tratadas. Asimismo, Pérez *et al.* (1998) reportan de un 30-44%, utilizando ese mismo tratamiento sobre propágulos de una yema de diferentes tamaños y diversas variedades

Al realizar el dot-blot se observó también una detección del 100% de RSD, no siendo efectivo el tratamiento térmico en ningún caso para la eliminación de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Fig. 6). Dichos resultados coinciden con los reportados por Ramallo & de Ramallo (2001), donde no obtuvieron saneamiento de RSD con el tratamiento

hidrotérmico a 50.5 °C/2 h aplicado a propágulos de una yema, en la mayoría de las variedades estudiadas, realizando la detección de la enfermedad mediante las técnicas de dot-blot e IFI, aunque lograron una atenuación de la bacteria. Resultados similares fueron obtenidos por investigadores de la EPICA de Jovellanos, Matanzas, Cuba, quienes no consiguieron erradicar el patógeno con ninguno de los tratamientos hidrotérmicos estudiados, incluyendo el de 50.5 °C/2 h, pero si disminuyó la concentración de células de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, según lo revelado por IFI (Pérez *et al.*, 1998).



Leyenda:
 1-16: Tto. Cámara húmeda
 C+: Control Positivo
 17-32: Tto. Agua a 50.5 °C 2 h
 C-: Control Negativo

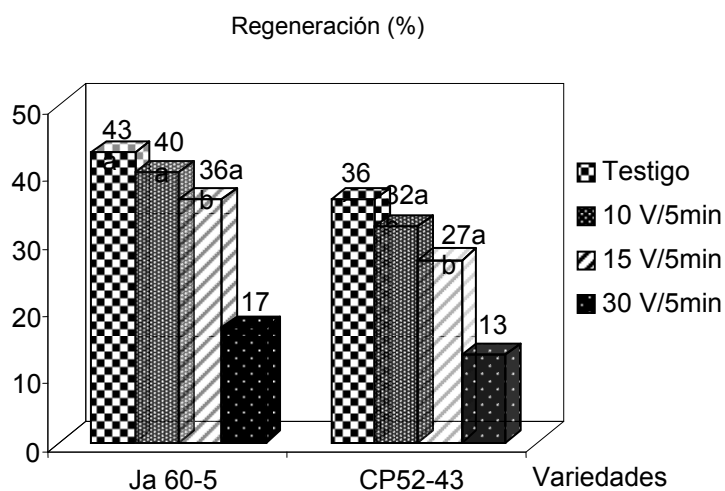
Fig. 6. Resultados del dot-blot en los tratamientos de termoterapia

Por otra parte (Piñón, 2001) afirma que para controlar el RSD es necesario que la semilla comercial haya recibido como mínimo tres tratamientos de hidrotermoterapia sucesivos, además de aplicar las medidas de control adecuadas, pues con uno solo no se logra la inactivación total del organismo causal de la enfermedad. Young *et al.* (2006) aseguran que la termoterapia de las plantas donantes reduce la incidencia del RSD, pero falla en la erradicación de la enfermedad.

Electroterapia y cultivo de ápices.

En la Fig. 7 se resumen los efectos de la corriente eléctrica sobre la regeneración de plantas

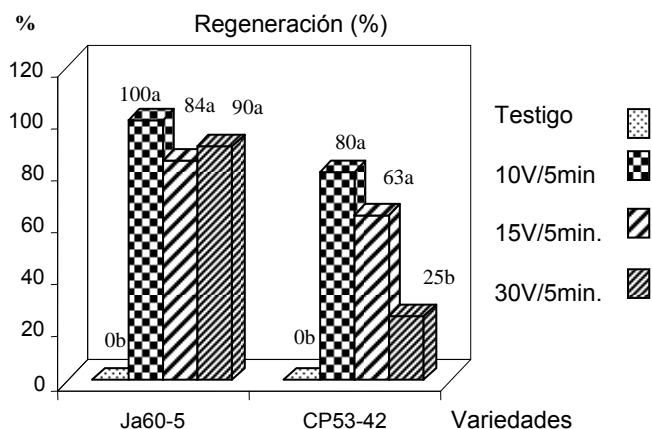
de diferentes variedades. Se muestra una respuesta similar de ambas variedades ante los diferentes tratamientos, observándose una disminución de este parámetro al aumentar el voltaje.



Letras minúsculas no coincidentes representan diferencias significativas entre tratamientos por variedad ($P < 0.05$).

Fig. 7. Efecto de los tratamientos de electroterapia en la regeneración de plantas.

Luego de la aplicación de la corriente eléctrica se observó una respuesta positiva en ambas variedades (Fig. 8). El porcentaje de plantas sanas fue mayor en todos los tratamientos aplicados con respecto al testigo en ambas variedades. En Ja 60-5, no existieron diferencias en cuanto al saneamiento a RSD en las tres variantes empleadas, lográndose hasta un 100% de sanidad cuando se aplicaron 10 V/5 min. Mientras que en CP 52-43 hay una disminución de este parámetro, cuando se somete al explante a 30 V/5 min, existiendo una respuesta diferencial entre variedades para este tratamiento.



Letras minúsculas no coincidentes representan diferencias significativas entre tratamientos por variedad ($P < 0.05$).

Fig. 8. Efecto de los tratamientos de electroterapia sobre el saneamiento a RSD.

Las plantas electroterapiadas pueden ser afectadas por los excesos de corriente y por la duración de los tratamientos, disminuyendo la regeneración de los explantes y la efectividad de la terapia, por lo que debe buscarse una combinación óptima para lograr una eficiencia adecuada (Hernández *et al*, 1997). Entre las alternativas utilizadas la aplicación 10 V/5 min fue la de mejores resultados, al combinar los mejores porcentajes de sanidad y regeneración, aunque no difieren mucho de lo logrado con 15 V/5 min, que es la que más se emplea en caña de azúcar. Esta técnica de saneamiento ha sido utilizada con alentadores resultados en varios cultivos para eliminar tanto virus como bacterias (Hernández, 1997).

Coincidiendo con Wagele (1978), en que con voltajes adecuados se logra una estimulación de los tejidos y se facilita su crecimiento más rápido y vigoroso, dicho crecimiento y organogénesis fue dependiente del tratamiento y del genotipo dado (Dawson, 1978; Golsworthy, 1987 citado por Hernández, 2000).

Otros investigadores como Matos (2002) informaron que la aplicación de 15 V/5 min producían la eliminación de escaldadura en un 100% en caña de azúcar con un 22% de

sobrevivencia. Estos porcentajes demuestran las posibilidades reales de saneamiento con electroterapia, corroborando los trabajos publicados hasta la fecha por Blanchard (1974) en el ajo, Hernández *et al.* (1995), Lozoya *et al.* (1996) y Bernal (1997) en la papa y finalmente, Hernández *et al.* (2002) en el banano.

Diagnóstico de plantas procedentes de diferentes técnicas.

En el diagnostico de las plantas procedentes de embriogénesis somática, de las 13 muestras analizadas, 6 resultaron negativas para un 46% de plantas sanas; en las obtenidas por organogénesis vía callo, de las 22 muestras analizadas el 100% resultaron enfermas y en el caso del cultivo de meristemo, las dos muestras resultaron negativas, o sea todas las plantas estaban sanas, confirmándose el diagnostico en el CENSA (ver Fig. 5).

Se pudo constatar que la técnica de dot-blot es capaz de detectar el agente causal del RSD en diferentes materiales provenientes del cultivo *in vitro*. En todos los casos se observa la ausencia de fenolización en las muestras colocadas en la membrana, cuando se aplica centrifugación, lo cual ofrece resultados más visibles y seguros. Lo anterior corrobora lo propuesto por Martínez *et al.* (1994), quienes plantean que el uso anticuerpos monoclonales para dot-blot, proporcionando una optima fijación de los antígenos bacterianos, introduce indudablemente mayor especificidad, en la técnica la cual se puede efectuar con un mínimo de error.

Esta técnica de dot-blot brinda un diagnóstico rápido, sensible, posibilita el trabajo con fluidos vasculares sin previa concentración y puede ser utilizada para detectar *L. xyli* en materiales procedentes de diferentes vías de cultivo. Es por ello que corroboramos los criterios de Iglesia *et al.* (2003) al incluirla para análisis de donantes y líneas procedentes del programa de micropropagación y otros métodos biotecnológicos, incluyendo los relacionados con la evaluación de

métodos de saneamiento o en obtención de semilla artificial.

Resultado del análisis por dot-blot

Los resultados del diagnostico en los diferentes tratamientos se pueden ver resumidos en la Tabla 1. Con el dot-blot se detecta la presencia del RSD en las variedades estudiadas de caña de azúcar, así como en los diferentes tipos de material obtenido por las técnicas biotecnológicas aplicadas.

Durante los últimos años se han venido empleando para la detección de *L. xyli* subsp. *xyli* varias técnicas como la microscopía con contraste de fase (Roach, 1992; Ramallo *et al.*, 1999) y mas actualmente la inmunoflorescencia indirecta (IFI) (Peralta *et al.*, 1997; Ramallo *et al.*, 1999; Iglesia *et al.*, 2003).

Ambos métodos permiten la observación y el conteo directo de las células bacterianas, pero necesitan de un observador especializado para realizar la evaluación y es limitado el número de muestras que se pueden procesar por día. Peralta *et al.* (1997), Ramallo & de Ramallo (2001) y Ramallo *et al.* (2000), aplicaron un ELISA simple y rápido pero con sus limitaciones.

Tabla 1. Resumen de la detección del RSD empleando dot-blot con diferentes orígenes del material vegetal.

Vía	Variedad	Muestras analizadas	Muestras positivas	% Infección
Banco de semilla	Ja60-5	20	20	100
Cult. de ápices	Ja60-5	6	6	100
Embriogénesis	C87-82	13	7	54
Organogénesis	Ja60-5	22	22	100
Cult. de meristemas	UCLV-Ja89-179	5	0	0
	UCLV-POJ89-112	5	0	0

CONCLUSIONES

1. El cultivo de ápices entre 0.5–0.7 mm y la termoterapia no fueron efectivos para la eliminación del RSD, diagnosticándose un 100% de plantas enfermas después de aplicadas ambas técnicas de saneamiento.

2. La electroterapia obtuvo resultados muy satisfactorios al eliminar la infección entre un 60–100% cuando se aplicaron tratamientos de 10 y 15 V/5 min.

3. La centrifugación de la savia, previa a la colocación de las muestras en la membrana, favorece la observación del resultado al emplear la técnica de dot-blot, la cual fue eficiente al aplicarse con un gran número y en diferentes tipos de muestras, al utilizar un monoclonal de producción nacional.

RECOMENDACIONES

Implementar la clarificación previa de las muestras en el protocolo de dot-blot, para la detección del RSD en estudios de campo y en materiales saneados de caña de azúcar.

REFERENCIAS

- Ahlfeld H & Lichts FO (1996) World Sugar and Sweetener Year Book and World Sugar Statistics. F.O. (eds). Ahlfeld H. Linchts, Ratzeburg, Germany.
- Bernal FJ (1997) Técnicas de saneamiento para la obtención de papa (*S. tuberosum* L.) var. desirée libre del virus del enrollamiento de la hoja. Tesis de Grado. Maestría en Biotecnología Vegetal. Universidad Central de Las Villas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba.
- Blanchard RD (1974) Electrotherapy a new approach to wound healing. *Proc. Am. Phytopath. Soc.* 1: 133-134.
- China A & Pérez JR (1997) Secuencia y manejo de la hidrotermoterapia para el control de enfermedades de la caña de azúcar. *ATAC* 1: 31-34.
- China A, Nass H, Doboín C & Díaz MD (2000) Enfermedades y daños de la caña de azúcar en Latinoamérica. *Imprecolor CA*, Barquisimeto, Venezuela.
- Damann, K. E. 1992. Effect of sugarcane cultivar susceptibility on spread of ratoon stunting disease by the mechanical harvester. *Plant Dis.* 76: 1148-1149.
- Dawson WO (1978) Recovery of tobacco mosaic virus RNA replication after incubation at 40°C. *Intervirology* 9: 295-303.
- Fitch MM, Lehrer AT, Komor FE & Moore PH. (2001) Elimination of sugar cane yellow leaf virus from infected sugar cane plants by meristem tip culture visualized by tissue blot immunoassay. *Plant Pathol.* 50: 676-680.
- Freire M (2001) Nueva metodología de embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido var. C87-51) empleando medios de cultivo líquidos. Tesis de Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara.
- Gillaspie AG Jr. & Teakle DS (1989) Ratoon stunting disease. En: Diseases of sugarcane-major diseases. Ricaud C, Egan BT, Gillaspie AG Jr. & Hughes CG (eds). Elsevier Publishing: Amsterdam, pp. 59–80.
- Gómez R (1996) Selección *in vitro* a la enfermedad carbón (*U. scitaminea* Syd.) de la caña de azúcar (*Saccharum* sp, híbrido). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. INCA. La Habana, Cuba.
- Hernández PR, Fontanella RJ, Noa CJ, Manso MR, Pichardo T, Cárdenas PH & Igarza C (1995) Electroterapia, nueva técnica para el saneamiento a virus en ajo (*Allium sativum* L.). *Reg. Patent.* 37/95 AO. 1C/08 Res. 1524/97. OPIC. Cuba.
- Hernández PR, Igarza CY, González Y, Peralta EL, Fontanella RJ, Noa CJ, Pichardo T, Alonso E, García L & Rodríguez M (1997) Nuevo método para el saneamiento a bacterias y virus en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, híbrido). *Cuaderno de Fitopatología*, 3: 153-157.
- Hernández R (1997) Obtención de plantas libres de patógenos. *Curso Teórico-Práctico de Propagación Masiva de Plantas*. FAO: Francia. IBP, Santa Clara, Cuba, pp. 31-43.

- Hernandez PR (2000) "Electrotherapy" technique eliminates viral and bacterial infections. *Agricell Report* 34: 9-10.
- Iglesia LA, Díaz RM, Álvarez RE, Peralta GEL & Pazos AV (2003) Optimización del Diagnóstico múltiple de la Escaldadura foliar y el Raquitismo de los Retoños de la caña de azúcar. *Protección Vegetal*. 18 (1): 15-18.
- Jiménez (1995) Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, híbrido). *Tesis de grado de Doctor en Ciencias Agrícolas*. UCLV. IBP. Santa Clara, Cuba.
- Jiménez E, García L, Suárez M & Alvarado Y (1997) Instructivo técnico para la micropropagación de la caña de azúcar. *Instituto de Biotecnología de las Plantas*, Santa Clara. Cuba.
- Lozoya-Saldaña H, Abello JF & García de la RG (1996). Electrotherapy and shoot tip culture eliminate potato virus X in potatoes. *Amer. Potato J.* 73: 149-154.
- Martínez Y, Peralta EL & González M (1994) Detección de *Clavibacter xyli subsp. xyli* mediante la técnica de dot-blot utilizando anticuerpos monoclonales. *Protección Vegetal* 9: 57-62.
- Martín D, Iglesia A, Pazos. V & Peralta. E (2001) Obtención y evaluación de un anticuerpo policlonal específico de *Leifsonia xyli subsp. xyli*. *Protección Vegetal*. 16: 10-14.
- Matos M (2002) Escaldadura foliar: Evaluación de métodos para el saneamiento y comportamiento de variedades comerciales de caña de azúcar. *Tesis de Maestría*. Universidad de la Habana, Facultad de Biología, La Habana, Cuba.
- Peralta GEL, Pedrosó M & Martínez Y (1997) Diagnóstico de Fitopatógenos. *Manual teórico-práctico*, CENSA, La Habana, Cuba.
- Pérez JR, Montalbán J, Figueredo Y, Matos M, Abrantes I, Barroso G & Delgado G (1998) Evaluación del sistema tradicional de producción de semilla empleado en Cuba para el control de enfermedades de la caña de azúcar. *Informe Final*. CITMA. INICA. La Habana, Cuba.
- Peteira B, González T, Orta C, Lagomasino I & Maribona R (1992) Saneamiento de RSD por cultivo de meristemo. *Protección Vegetal* 7: 97-101.
- Piñón D (2001) Hacia una fitoprotección ecológica de plagas en el SEFIT. En: *Curso de actualización en temáticas de sanidad vegetal (SEFIT)*. Piñón D (ed)., INICA, La Habana, Cuba.
- Ramallo J & de Ramallo NEV (2001) Aplicación de la hidrotermoterapia para la obtención de caña semilla de sanidad controlada. *Avance Agroindustrial*. 22: 16-18.
- Ramallo J, de Ramallo NEV & Roncedo M (1999) Achaparramiento de la caña soca: distribución e incidencia en Tucumán. *Avance Agroindustrial* 76: 17-20.
- Ramallo J, de Ramallo NEV & Ploper LD (2000) Diagnóstico de enfermedades de la caña de azúcar. Metodologías aplicadas por la EEAOC. *Avance Agroindustrial*, 21: 8-12.
- Roach BT (1992) Susceptibility to ratoon stunting disease in the *Saccharum* complex and the feasibility of breeding for resistance. *Sugar Cane*, 3: 11.
- Santana I (1994) Estudio de la variabilidad en las poblaciones de caña de azúcar obtenidas por el cultivo de tejido. *Tesis de Grado de Doctor en ciencias Agrícola*. INICA, La Habana, Cuba.
- Sordi R & Tokeshi H (1988) Cleaning leaf scald-infected sugarcane plants using *in vivo* thermotherapy plus meristem tip culture. *Summa Phytopathol.* 13: 93-112.
- Wagele R (1978) Procedimientos para influir en el crecimiento de las células e individuos bacterianos, animales y vegetales. *Rusia Patent*, 2841. 933 AL.
- Young AJ, Petrasovits LA, Croft BJ, Gillings BM & Brumbley SM (2006) Genetic uniformity of international isolates of *Leifsonia xyli subsp. xyli*. causal agent of ratoon stunting disease of sugar cane. *Australian Plant Pathol.* 35: 503-511.

Estudio de la Actividad Ácido Láctica de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y su Relación con el Perfil de Plásmidos Durante el Almacenamiento en Refrigeración

Juan Carlos Sigala¹, Martha Patricia Tafolla², Jose Pablo Pérez-Gavilán.

¹Instituto de Biotecnología e ²Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. E- mail: pgavilan@servidor.unam.mx, 56229190

Palabras clave: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, actividad láctica, plásmido

RESUMEN

Se analizó si existe relación entre la disminución de la actividad ácido láctica y la pérdida de plásmidos en *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* cuando es almacenado en refrigeración. Se realizaron cinéticas de crecimiento de este microorganismo en un biorreactor y se determinó la producción de ácido láctico y la actividad láctica de muestras cosechadas en fase exponencial y fase logarítmica de crecimiento. Estas mismas muestras celulares se almacenaron en refrigeración con y sin control de pH y se estudió la viabilidad celular, la producción de acidez, el pH y el perfil de plásmidos a diferentes días. Los resultados resaltan la importancia de controlar el pH durante el almacenamiento en refrigeración de estas bacterias, ya que resultó ser el factor determinante en la disminución de la actividad y no la pérdida de material genético como en un inicio se pensó.

Key words: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, lactic acid activity, plasmid

ABSTRACT

The correlation between lactic acid activity decrease and the lost of plasmid in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* stored under refrigeration, was analyzed. Growth kinetics of this microorganism was performed in a bioreactor and samples were taken for lactic acid production and lactic acid activity from cells grown in exponential and

logarithmic growth phases. For this purpose, the cellular samples were stored in refrigeration with and without pH control and the cellular viability, acidity production, pH and plasmids profile at different days, were studied. The results emphasize the importance of controlling the pH during the bacterial storage in refrigeration as the determining factor in the activity reduction, and discarded the lost of the genetic material as the cause of its decline, as was initially thought.

INTRODUCCIÓN

Además de su ADN cromosomal, muchas bacterias poseen pequeñas moléculas de ADN circular llamados plásmidos los cuales se duplican de manera independiente y contienen información accesoria (Blanco, 1991). En las bacterias lácticas muchas cualidades de interés industrial, tales como el metabolismo de lactosa (Crown *et al.*, 1983; Maeda & Gasson, 1986), la producción de proteinasas (De Vos *et al.*, 1989) el transporte de citrato, los mecanismos de resistencia a fagos y la producción de bacteriocinas, se encuentran codificadas en plásmidos.

En aquellas cepas de *L. lactis* ssp. *lactis* consideradas buenas productoras de ácido láctico, los genes que codifican para el sistema de fosfotransferasa de lactosa (PTS lactosa), para la fosfo beta-galactosidasa y para la ruta de la tagatosa, puntos clave en el metabolismo de lactosa, se encuentran localizados en un solo operón identificado en plásmidos de 28 a 60 kb.

El significado comercial de las bacterias lácticas utilizadas en la manufactura de los productos lácteos fermentados se debe en gran medida a la capacidad de convertir la lactosa y otros azúcares en ácido láctico. *L. lactis* ssp. *lactis* forma parte de los denominados cultivos iniciadores (CI) los cuales se utilizan en la elaboración de todos los productos lácteos fermentados y su intervención como materia prima es determinante en la calidad del producto final. En nuestro país existe una gran demanda por los cultivos iniciadores y estos son distribuidos exclusivamente por compañías extranjeras.

Respecto al almacenamiento de los cultivos, la refrigeración representa una buena alternativa ya que requiere de equipo más sencillo y económico comparado con procesos de liofilización o congelación. Se ha encontrado que los cultivos líquidos refrigerados mantienen una viabilidad y una actividad láctica aceptable por un tiempo de 15 días. Sin embargo, pasado este tiempo las bacterias pierden casi en su totalidad la capacidad de producir ácido. Anteriormente se planteó la posibilidad de que esta disminución de actividad estuviera ligada a la pérdida de plásmidos. Con base en esto, se desarrollo el presente trabajo para abundar en el conocimiento de los aspectos relacionados con la actividad, los plásmidos y el efecto del pH en cultivos líquidos refrigerados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

La cepa empleada es *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BM147, perteneciente a la Colección de Cultivos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM-48) de la Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. Dicha cepa se mantuvo en leche descremada estéril al 11% de sólidos totales, se resembró cada 2 semanas y se almaceno a 4°C.

Medios de cultivo

Leche descremada al 11% de sólidos totales, Agar APT (Agar, triptona, extracto de levadura, fosfato ácido de potasio, citrato de sodio, glucosa,

tween 80, silfato de magnesio, cloruro de manganeso, sulfato ferroso) (Evans y Nivel, 1951 y Deibel, Evans y Nivel, 1957), medio liquido Elliker modificado (Klaenhammer *et al.*, 1978), Agar Reddy modificado (Reddy *et al.*, 1969 y Reddy *et al.*, 1972) y medio industrial para fermentación (Goldhaber, 1982).

Cinéticas en biorreactor.

Se llevo a cabo en una jarra de acero inoxidable de 5 L adaptada a una consola New Brunswick Sci. Co. M-19-1400 que cuenta con agitación magnética, control de pH y de temperatura (Stanburry & Whitaker, 1989). Las condiciones fueron las siguientes (Córdova, 1990 y Chavarri *et al.*, 1988).

Tabla 1. Condiciones empleadas durante las cinéticas en biorreactor

Medio de cultivo	Medio industrial (MI)
Volumen de inóculo	5% v/v
Volumen operativo	3 L
Temperatura	29°C
pH	6.9-7.0
Agente neutralizante	NaOH 20% (5N)
Agitación	200 rpm
Tiempos de cosecha	4 y 8 h

Al momento de la cosecha de bacterias se interrumpió el control de temperatura con una unidad de enfriamiento Haake-KT33 que bombea agua entre 2 y 4°C. La velocidad de agitación y el control de pH se mantuvieron constantes. Cuando se alcanzó la temperatura de 4°C se colectaron las muestras, un litro para la muestra con control diario de pH (muestra MA) y 500ml para la muestra sin control de pH (muestra MB) y posteriormente se refrigeraron.

Determinaciones

Cuenta de microorganismos viables (CMV)

Se hizo por el método de vaciado en placa en agar APT a partir de diluciones decimales. Las cajas se incubaron a 29°C por 48 h y el conteo se expreso en UFC/ml (unidades formadoras de colonias/ml).

Producción de ácido láctico

Se determino a partir de la cantidad de NaOH al 20% que fue necesario añadir para mantener el pH constante (pH 6.9 o 7), considerando que para neutralizar una mol de ácido láctico (PM= 90 g/mol) se requiere de una mol de NaOH (PM= 40 g/mol).

Actividad láctica.

Expresa la capacidad que tiene una cepa de producir ácido láctico bajo las siguientes condiciones: 50 ml de leche descremada al 11% de sólidos totales pasteurizada (63°C, 30 min) se inoculó al 1% con los caldos de fermentación y se incubo a 30°C durante 6 h. Al cabo de este tiempo se tomó una alícuota de 9 ml y se tituló con NaOH 0.1N utilizando fenolftaleína como indicador; el gasto de NaOH 0.1N se expresa como % de ácido láctico. Bajo estas condiciones, el % de ácido láctico producido por el microorganismo menos la acidez inicial de la leche se denomina AL.

Actividad específica (AE)

Se expresa en nanomoles de ácido láctico producido por UFC en 5 h. Se obtuvo un valor de referencia a partir de un cultivo ejemplar para poder comparar los valores que se obtendrían a lo largo de la experimentación, este fue de 1.5×10^{-5} nanomoles de ác. láctico por UFC en 5 h de crecimiento. Para efecto de la experimentación se consideraron valores de AE anormales sólo aquellos que eran 10 veces mayores o menores que la referencia.

Medición de pH.

Se efectuó con un electrodo Beckman convencional adaptado a un potenciómetro Beckman 40.

Extracción de Plásmidos y Electroforesis.

Obtención de paquete celular.

La cepa de interés se sembró en 10 ml de medio líquido M-17 (Terzaghi & Sandine, 1975) con un inóculo al 1% y se incubó a 29°C toda la noche. Al día siguiente se resembró en 10 ml de medio Elliker modificado (inóculo al 2%) durante 4 h a 29°C y se centrifugó en frío a 3,000 rpm por 10 min para obtener así el paquete celular.

Extracción de plásmidos

Tabla 2. Soluciones empleadas para la extracción de plásmidos

<i>Solución I</i>	50mM Tris (pH 8) y 1mM EDTA (pH 8)
<i>Solución II</i>	50mM glucosa, 25mM Tris.Cl (pH 8), 10mM EDTA (pH 8) y lisozima (10 mg/ml)
<i>Solución III</i>	0.2 N NaOH y 1% de SDS (dodecil sulfato de sodio)
<i>Solución IV</i>	5M acetato de potasio (60ml), ácido acético glacial (11.5ml) y H ₂ O (28.5ml)

- Se suspendió y se lavo el paquete celular en 3 ml de solución I fría. Se centrifugo en frío a 3000 rpm por 10 min y se eliminó el sobrenadante.
- Se vuelve a suspender y a lavar en 1 ml de solución fría y en un tubo Eppendorf se centrifuga a 5,000 rpm por 5 min y se eliminó el sobrenadante.
- Se resuspendió en 10 µl de solución II. Se incubó a 37°C por 5 min.
- Se adicionaron 200 µl de solución III recién preparada y se mezcló. Se dejo en hielo por 5 min.
- Se adicionaron 150 µl de solución IV fría. Se mezcló y se dejo en hielo por 3 min.
- Se centrifugo a 12,000 rpm por 6 min a 4°C
- Se agregaron 2 µl de solución de RNA asa (10 mg/ml) y se incubo a 37°C por 5 min.
- Se adicionó 500 µl de fenol preparado y se mezcló.

- Se adicionaron 150 µl de una mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (24:1)
- Se centrifugo a 10,000 rpm por 8 min a temperatura ambiente
- Se removió la fase superior acuosa translúcida.
- Se adicionaron 0.6 vol de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se mantuvo a temperatura ambiente por 45 min
- Se centrifugo a 12,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante aspirando con la micropipeta
- Se enjuagó el pellet de ADN con 50 µl de etanol al 70% frío. Se centrifugo a 12,000 rpm por 5 min a 4°C
- Se secó el pellet de ADN a temperatura ambiente por 5 min
- Se redisolvió el ADN en 10 µl de agua estéril y se guardó en congelador (-20°C). Al día siguiente se corrió la electroforesis.

Esta metodología de extracción de plásmidos se basó fundamentalmente en la técnica propuesta por Sambrook et al. (1989) con modificaciones por lo descrito por Currier & Nester (1976) Klaenhammer et al. (1978), LeBlanc & Lee (1979), Anderson & MacKay (1983), Orberg & Sandine (1984) y Frére (1994).

Electroforesis

Se llevo a cabo en un gel de agarosa (Aldrich et al., 1976) al 0.8% en buffer TAE (20 mM Tris, 10 mM ácido acético y 2 mM Na₂EDTA, pH 8) a 80 V durante 2.1 h. El volumen de muestra de ADN plasmídico en cada pozo de gel fue de 10µl Los géles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 15 min. El peso molecular de los plásmidos fue estimado a partir de una gráfica semilogarítmica de peso molecular contra movilidad relativa (rf), empleando los marcadores de peso molecular comerciales fago lambda digerido con *Hind*III o digerido con *Hind*III y *Eco*RI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de plásmidos

Se realizó la extracción de plásmidos de una cepa lactosa positiva (*lac*⁺) y una cepa lactosa negativa (*lac*⁻), con la finalidad de observar si la deficiencia para coagular la leche se relaciona con la pérdida de algún plásmido. Para ello, a partir de un cultivo viejo refrigerado de *L. lactis* en leche descremada al 11% de sólidos totales, se sembró superficialmente en placas de agar Reddy modificado y se incubó en anaerobiosis a 29°C por 48 h. En este medio las cepas *lac*⁻ son más pequeñas, de color blanco y no presentan halo (Reddy et al., 1969). Para la *lac*⁺ se sembró de manera superficial en placas de agar APT, incubándolas a 29°C por 48 h en anaerobiosis. En la Fig. 1 se muestran los perfiles de plásmidos de una cepa *lac*⁺ y de una cepa *lac*⁻ de *L. lactis* ssp. *lactis*.

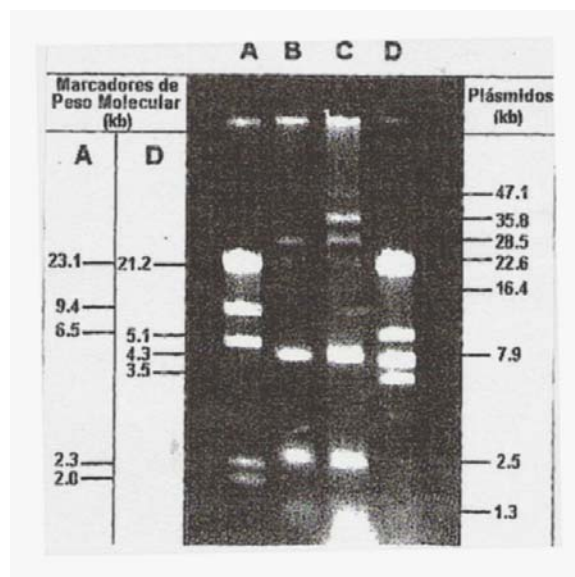


Fig. 1. Perfil de plásmidos de *L. lactis* ssp. *lactis* lactosa⁺ y lactosa⁻. (A) Marcador de peso molecular (fago λ cortado con *Hind* III). (B) *L. lactis* ssp. *lactis* *lac*⁻. (C) *L. lactis* ssp. *lactis* *lac*⁺. (D) Marcador de peso molecular (fago λ cortado con *Hind*III y *Eco*RI).

En el perfil de plásmidos de la cepa *lac*⁺ se observan 8 bandas de diversos pesos moleculares. También se observa que el perfil de plásmidos de la cepa *lac*⁻ carece de la segunda banda (35,792 pb);

podríamos afirmar que en ese plásmido específicamente, se encuentra localizado el operón de lactosa necesario para el transporte e hidrólisis de este disacárido por el sistema fosfo enol piruvato-fosfo transferasa (PTS) y de la vía de la tagatosa, tal y como se ha reportado en la bibliografía para otro tipo de cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* lactosa positivas a lo largo de los últimos años (Mckay *et al.*, 1972; Mckay & Baldwin, 1974; Efstathiou & Mckay, 1976; Klaenhammer *et al.*, 1978; Crow *et al.*, 1983; Gasson, 1983 y Sinha 1989). En varias de estas referencias se ha establecido que el plásmido en cuestión suele ser de los de mayor peso molecular del perfil y va de las 28 a las 60 kb, lo cual también coincide con nuestros resultados.

Tabla 3. Pesos moleculares de los plásmidos de la cepa Lac⁺ de *L. lactis* ssp. *lactis*.

Número de plásmido	Peso molecular (pb)
1	47,122
2	35,792
3	28,461
4	22,632
5	16,420
6	7,886
7	2,507
8	1,320

Los pesos moleculares de los plásmidos son mostrados en la Tabla 3. Como puede apreciarse en esta tabla, el perfil de plásmidos es muy parecido a los reportados en la bibliografía, en especial a los obtenidos por Sinha (1989), Orberg & Sandine (1984) y Anderson & McKay (1983).

Como es sabido en la industria láctea, los iniciadores deficientes son aquellos que no coagulan la leche después de 16 h de incubación a 21°C o después de 6 h a 29°C, empleándose un inóculo al 1%. Esta deficiencia no solamente se debe a la pérdida de la capacidad para metabolizar la lactosa sino que también interviene el sistema de

proteinasas que dota a las células de los péptidos y aminoácidos necesarios para su crecimiento. Algunos investigadores han encontrado una pérdida simultánea de la capacidad de metabolizar lactosa y de producir proteinasas (McKay & Baldwin, 1974) e incluso otros lo asocian a un mismo plásmido de alto peso molecular entre 50 y 60 kb (Gasson, 1983). En nuestro trabajo sólo se evaluó la calidad de la cepa en relación a su capacidad de producir ácido. Las cepas que carecían del segundo plásmido de 35.8 kb las hemos identificado como lac⁻ pero cabe la posibilidad de que su deficiencia se deba a la carencia del sistema de proteinasa o a un efecto combinado. Por el momento se ha demostrado la pérdida de un plásmido específico en aquellas cepas deficientes para coagular la leche.

Cinéticas en biorreactor

L. lactis ssp. *lactis* alcanza la fase estacionaria de crecimiento pasadas las 6 h. Era de interés llevar a cabo una cinética a las 8 h de incubación (F8), para tener una población en fase estacionaria de crecimiento y una cinética a las 4 h (F4) para tener una población en fase exponencial, para que se pudieran contrastar los resultados obtenidos en ambas situaciones.

Tabla 4. Resultados de las determinaciones de cuenta total de microorganismos, producción de ácido láctico, actividad y actividad específica durante las cinéticas a las 4 y 8 h de

DETERMINACION	CINETICA	
	4 h	8 h
Cuenta total de microorganismos (UFC/ml)	5.26 x 10 ⁹	1.78 x 10 ¹⁰
Producción de ac. láctico (g ac. láctico/L de medio)	8	37.7
Actividad	0.44	0.48
Actividad específica (nmoles de ac. láctico/UFC en 5 h)	1.5 x 10 ⁻⁵	1.5 x 10 ⁻⁵

Incubación. Los valores de actividad específica (AE) obtenidos en las dos cinéticas de trabajo están cercanos al valor de referencia (1.5×10^{-5} nmol ácido láctico/UFC en 5 h), por lo tanto, se consideran valores normales. La AE es útil al equiparar la capacidad de producción de ácido de muestras que contengan distinta cantidad de bacterias como ocurre en el transcurso de las cinéticas de este trabajo.

El tiempo de duplicación promedio fue de 60 min \pm 0.1. Este valor coincide con lo descrito por Sandine (1996) para varias bacterias lácticas mesófilas.

Almacenamiento a 4°C

En las muestras almacenadas a partir de la cinética de 8 h fue necesario agregar 27.4 ml de NaOH al 20% para tener control de pH cercano a la neutralidad, de los cuales 25 ml fueron agregados los primeros 7 días. En cuanto a la cuenta total de microorganismos, se observa una fuerte disminución de la población microbiana; a los 30

días de almacenamiento prácticamente todas las bacterias han muerto, independientemente del control de pH (Tabla 5). La actividad para este conjunto de muestras también disminuye al transcurrir el tiempo. Por otro lado, los valores de AE se consideran normales pues estuvieron cercanos a la referencia excepto en el caso de la MB-F8 a los 29 días, en donde el valor fue diez veces mayor. Esto último pudiera significar que las bacterias sobrevivientes son incluso mejores productoras de ácido o por lo menos no han perdido esta capacidad; esto se corroboró al sembrar algunas de estas colonias en leche y la coagularon perfectamente después de un periodo normal de incubación.

Para el caso de las muestras cosechadas y almacenadas a partir de la cinética de 4 h, se controló el pH agregando un total de 93.6 ml de NaOH al 20%. En cuanto a la cuenta total de microorganismos, la diferencia más notable se presenta al término del almacenamiento en la

Tabla 5. Resultados de pH, cuenta total de microorganismos, actividad y actividad específica durante el almacenamiento a 4°C de ambas cinéticas con y sin control de pH (= se refiere a un valor de AE igual al de la referencia).

DETERMINACIÓN	ALMACENAMIENTO A 4°C											
	Cinética de 4 h						Cinética de 8 h					
	Control de pH MA-F4			Sin control pH MB-F4			Control de pH MA-F8			Sin control de pH MB-F8		
	Día 1	Día 14	Día 28	Día 2	Día 15	Día 29	Día 1	Día 14	Día 28	Día 2	Día 15	Día 29
pH	7	7	7	5.58	4.78	4.68	7	7	7	5.6	5.24	5.02
Cuenta total de bacterias. (%)	100	82.5	67.3	100	67.3	0.7	100	35	1.5	100	29	2.1
Actividad (%)	100	78.2	65.6	100	61	2.2	100	74	21.4	100	58.2	7.1
Actividad específica	=	=	=	=	=	> 10 veces	=	=	=	=	=	> 10 veces

Muestra sin control de pH, pues apenas sobrevive un 0.7% de la población; en esta misma muestra se presenta la mayor disminución de actividad. Los valores de AE para estas muestras se consideraron normales excepto la del día 29 sin control de pH, que nuevamente fue diez veces mayor a la referencia.

El grupo de células con mejor comportamiento durante el almacenamiento fue la muestra cosechada en fase exponencial y con control de pH durante el almacenamiento (MA-F4). Estas células presentan una actividad metabólica alta al ser cosechadas de tal forma que al neutralizar el ácido láctico producido durante el almacenamiento, se ven estimuladas a seguir consumiendo la lactosa y demás nutrientes, sin peligro de daño por efecto de la disminución de pH, lo que las hace sobrevivir de mejor manera.

Por otro lado, el control de pH en la muestra cosechada a las 8 h (MA-F8) fue favorable únicamente los primeros 15 días de almacenamiento; esto quizá se deba a que estas bacterias fueron cosechadas en plena fase

estacionaria de crecimiento lo cual implica tener una desacelerada actividad metabólica ocasionando que las células gradualmente mueran, no obstante tener un pH cercano a la neutralidad. Sin embargo, los valores de actividad siempre fueron mejores en la muestra que contó con control de pH debido a que no existió daño por exposición prolongada al ácido láctico.

Por otra parte, se observó en los perfiles de plásmidos de todas las muestras una disminución gradual de la concentración de material genético ya que las bandas fueron cada vez menos intensas. Esto indica que existe una pérdida general del material genético durante el almacenamiento, independientemente de que las células provengan de una población en fase exponencial o en fase estacionaria de crecimiento y de que se tenga un control o no de pH.

En la tabla 6 se han agrupado los porcentajes de las poblaciones de las diferentes muestras durante el almacenamiento que presentaron determinado plásmido en su perfil.

Tabla 6. Porcentaje de células en las que aparece determinado plásmido en su perfil

HORAS DE COSECHA	CONTROL DE pH	DIA DE ALMACENAMIENTO	NÚMERO DE PLÁSMIDO Y PESO MOLECULAR (pb)							
			1 47,122	2 35,792	3 28,461	4 22,632	5 16,420	6 7,886	7 2,507	8 1,320
8	SI	1	90	90	10	90	90	100	100	100
		14	100	100	80	100	100	100	100	100
		28	80	100	60	80	20	100	100	100
	NO	2	90	100	50	90	80	100	100	100
		15	100	100	70	100	90	100	100	100
		29	80	100	60	100	40	100	100	100
4	SI	1	90	90	90	100	90	90	100	90
		14	90	100	20	80	80	100	100	90
		28	90	100	60	80	40	100	100	100
	NO	2	100	100	70	100	100	100	100	100
		15	90	90	30	90	80	100	100	100
		29	60	100	70	70	30	100	100	100

Como ya se había mencionado, al comparar los perfiles de los plásmidos de las cepas lac⁺ con las cepas lac⁻ se determinó que el plásmido que contenía la información necesaria para el metabolismo de lactosa era el número dos (36 kb) por lo que era importante conocer el comportamiento que pudiera tener esta banda a lo largo del almacenamiento, ya que en el trabajo de Córdova (1994) se sospechaba que la disminución de la actividad durante el almacenamiento pudiera estar ligada a la pérdida de algún plásmido.

A lo largo del almacenamiento se observó que el plásmido número dos se conservó en el 90 o 100% de las poblaciones de las diferentes muestras y a diferentes días. Es claro que no existe una pérdida específica y gradual de este plásmido y por lo tanto no es responsable directo de la disminución de la actividad ácido láctica. Como ya ha sido establecido anteriormente, parece ser que el control de pH favorece la supervivencia de las células, siendo este el factor determinante para tener una buena actividad.

Los plásmidos más inestables fueron el número tres de 28,461 pb y el número cinco de 16,420 pb. En las dos muestras de la cinética a las 8 h, la mayor pérdida del plásmido tres se presentó en los primeros días de almacenamiento y en las muestras de la cinética a las 4 h, a la mitad del almacenamiento; en ambos casos el control de pH no parece influir en la aparición de este plásmido. En todas las muestras en los primeros 15 días, el plásmido cinco aparece en un 80 a 100% de la población, pero al cabo del periodo sólo aparece en un 40% tanto en la MA-F4 como en la MB-F8, en un 30% de la MB-F4 y en un 20% en la MA-F8. Se observa que este plásmido disminuye invariablemente al término de los periodos de almacenamiento independientemente del control de pH.

CONCLUSIONES

- La disminución de la actividad láctica de *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*, cuando es

almacenado en refrigeración en el medio líquido en el que fue producido, no se debe a la pérdida específica de uno o más plásmidos, sino al marcado deceso de células, de tal forma que cuando se realiza la determinación de la actividad, el inóculo cada vez es menor.

- El control de pH en las muestras almacenadas a 4°C evita la muerte celular, lo que a su vez provoca el tener valores de actividad aceptables
- El control de pH origina mejores resultados en las muestras cosechadas a las 4 h que en las de 8 h; la vida útil para cada caso es de 28 y 14 días respectivamente.
- Se propone conservar las bacterias lácticas en refrigeración empleando el mismo medio en el que fueron producidas y contando con control de pH.

REFERENCIAS

- Aldrich MJ, Sánchez D, Elwell L & Falkow S (1976) Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 127: 1529- 1537.
- Anderson DG & McKay LL (1983) Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from *Streptococcus lactis*. *Appl. Environm. Microbiol.* 46: 549-552.
- Blanco A (1991) Química biológica. Editorial El Ateneo. 5ª edición, 2ª reimpresión. Argentina
- Córdova AMS (1994) Variaciones en la capacidad de producción de ácido láctico y pH durante la producción y almacenamiento de las cepas *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BM147 y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* BM 149 y su correlación con el perfil de plásmidos. Tesis de grado de maestría en biotecnología. UACPyP, CCH, UNAM, México, PP 59
- Crow VL, Davey, GP, Pearce LE & Thomas TD (1983) Plasmid linkage of the D-tagatosa 6-phosphate pathway in *Streptococcus lactis*: Effect

- on lactose and galactose metabolism. *J. Bacteriol.* 153: 76-83
- Currier TC & Nester EW (1976) Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Anal. Biochem.* 76: 431-441
- Chavarri FJ, De Paz M, & Núñez M (1988) Optimization of fermentation parameters for the production of concentrated starters from nonbitter *Streptococcus lactis* INIA 12. *J. Food Sci.* 53: 1854-1857.
- Deibel RH, Evans JB & Niven CF (1957) Microbiological assay for the thiamin using *Lactobacillus viridescens*. *J. Bact.* 74: 818-821.
- De Vos WM & Simons G (1988) Molecular cloning of lactose genes in dairy lactic streptococci: the phosphor- α -galactosidase and beta-galactosidase genes and their expression products. *Biochimie* 70: 461-473.
- De Vos WM, Vos P, Simons G & David S (1989) Gene organization and expression in mesophilic lactic acid bacteria. *J. Dairy Science.* 72: 3398-3405.
- Evans JB & Niven CF (1951) Nutrition of the heterofermentative Lactobacilli that cause greening of cured meat products. *J. Bact.* 62: 599-603.
- Frère J (1994) Simple method for extracting plasmid DNA from lactic acid bacteria. *Letters in Appl. Microbiol.* 18: 227-229.
- Gasson MJ (1983) Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154: 1-9.
- Goldhaber (1982) Estudios para la producción y conservación de algunos microorganismos de interés lactológico. Tesis de grado de maestría en ciencia y tecnología de alimentos. UI. México. PP 126.
- Klaenhammer TR, McKay LL & Baldwin KA (1978) Improved lysis of group N streptococci for isolation and rapid characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Appl. Environm. Microbiol.* 35: 592-600.
- Kuhl SA, Larsen LD & McKay LL (1979) Plasmid profiles of lactose-negative and proteinase-deficient mutants of *Streptococcus lactis* C10, ML3 y M18. *Appl. Environm. Microbiol.* 37: 1193-1195.
- Leblanc DJ & Lee LN (1979) Rapid screening procedure for detection of plasmids in Streptococci. *J. Bacteriol.* 140: 1112-1115
- Maeda S & Gasson M (1986) Cloning, expresión and location of the *Streptococcus lactis* gene for phospho- β -galactosidase. *J. Microbiol.* 132: 331-340.
- McKay LL & Baldwin KA (1974) Simultaneous loss of proteinase-and-lactose-utilizing enzyme activities in *Streptococcus lactis* and reversal of loss by transduction. *Appl. Bacteriol.* 28: 342-346.
- McKay LL, Baldwin KA & Zottola EA (1972) Loss of lactose metabolism in lactic Streptococci. *Appl. Bacteriol.* 23: 1090-1096.
- Orberg PK & Sandine WE (1984) Microscale method for rapid isolation of covalently closed circular plasmid DNA from group N Streptococci. *Appl. Environm. Microbiol.* 47: 677-680.
- Reddy MS, Vedamuthu ER, Washam CJ & Reinbold GW (1969) Differential agar médium for separating *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *Appl. Microbiol.* 18: 755-759.
- Reddy MS, Vedamuthu ER, Washam, CJ & Reinbold GW (1972) Agar medium for differential enumeration of lactic Streptococci. *Appl. Microbiol.* 24: 947-952.
- Sambrock J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Book 1. Cold Spring Harbor Laboratory. USA.
- Sandine WE (1996) Commercial production of dairy starter cultures. In: Dairy starters cultures. Cogan TM & Accolas JP (eds) VCH Publishers Inc. USA., pp. 191-206.
- Sinha RP (1989) A new simple method of curing plasmids in lactic Streptococci. *FEMS Microbiol. Letters*, 57: 349-352.

- Stanbury PF & Whitaker A (1989) Principles of fermentation technology. Pergamon Press. USA.
- Terzagui BE & Sandine WE (1975) Improved medium for lactis streptococci and their bacteriophages. Appl. Microbiol. 29: 807-813.

Nuevos Métodos para la Detección de Residuos de Organismos Genéticamente Modificados en Alimentos Basados en el ADN

Yendi Arely Cruz Flores*, Raúl Rodríguez Herrera, Cristóbal Noé Aguilar, Juan Carlos Contreras Esquivel

*Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. V. Carranza e Ing. José Cárdenas s/n col.
República. C.P. 25280. Saltillo Coahuila, México tel. +52 (844) 4169213, 4161238, Fax
+52 (844) 4390511.
E-mail: yendiarely@hotmail.com*

Palabras clave: PCR, PCR múltiple, PCR en tiempo real, resonancia de plasmones superficiales.

RESUMEN

La detección de residuos de organismos genéticamente modificados (OGM) en alimentos se ha convertido en un tema de gran actualidad por el incremento del número de productos derivados de OGM que han sido lanzados al mercado y el aumento de demandas por parte de los consumidores para que se establezcan regulaciones más estrictas en el etiquetado de estos productos. En este artículo se describen la utilización de nuevas metodologías para la detección de organismos genéticamente modificados, sus ventajas y desventajas.

Key words: PCR, multiplex PCR, real time PCR, surface plasmon resonance.

ABSTRACT

The detection of genetically modified organisms residues (GMO) in foodstuff has become an actual subject, due to the increase in the number of products derived from GMO that have been sent to the market. Considering the growing demands from the consumer's side, stricter regulations have been settle down in the labeling of these products. In this work, advantages and disadvantages for the use of new methodologies for GMO detection, are described.

INTRODUCCIÓN

La detección de residuos de organismos genéticamente modificados (OGM) en alimentos se ha convertido en un tema de gran actualidad por el incremento del número de productos derivados de OGM que han sido lanzados al mercado y el aumento de demandas por parte de los consumidores para que se establezcan regulaciones más estrictas en el etiquetado de estos productos. La Unión Europea (UE) tiene regulaciones para el etiquetado desde 1997, de productos que contengan más del 0.9% de soya Roundup Ready y maíz Bt-176 en ingredientes específicos (Reg. 49/200/EEC) y para aditivos y saborizantes derivados de cultivos GM (Reg. 50/2000/EEC). En México, el 18 de marzo del 2005 se publicó en el Diario Oficial de la Federación la ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (DOF 18-03-2005). Basados en lo anterior, existen a nivel comercial para la detección de OGM diferentes técnicas las cuales se agrupan en dos categorías: aquellas que utilizan al ADN y aquellas que utilizan el análisis de proteínas. La reacción en cadena de la polimerasa es la técnica más utilizada para la detección de OGM sin embargo recientemente se ha descrito la utilización de otras técnicas para este propósito. El objetivo del presente trabajo es describir los nuevos métodos para la detección de residuos de organismos genéticamente modificados en alimentos así como señalar sus ventajas y desventajas.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Esta técnica es un método enzimático que permite copiar de forma experimental una zona concreta de un genoma, pudiéndose obtener hasta millones de copias en un tubo de ensayo. En un estudio realizado por Jeng *et al.* (2003), reportaron el análisis de semillas de soya y sus productos para detectar la presencia de genes de soya Roundup Ready. La mayor parte de los productos de soya son generados a partir de un proceso de calentamiento, el cual daña el ADN utilizado para la reacción de PCR. Sin embargo por PCR se logró la amplificación de segmentos de OGM (genes *epsps*, *lectin* y del promotor 35S) en los productos terminados de soya. La fermentación es otra parte importante del proceso de productos a base de soya, en donde el ADN después de un largo periodo de fermentación (más de 180 días) es severamente dañado. Por lo que el gen *epsps* no fue detectado en las muestras analizadas.

En México, un estudio más reciente en donde se analizaron muestras de soya procedente de EUA para identificar la presencia de los genes transgénicos, reveló en las muestras importadas la presencia de secuencias de los genes *epsps*, *cry 1A* y del promotor 35S CaMV. De la soya identificada como transgénica se elaboraron diferentes alimentos (tófu, leche, yogurt, chorizo, harina y germinados) y se tomaron muestras de los puntos críticos de su elaboración de acuerdo a cambios drásticos de temperatura y pH. En este trabajo se identificó la presencia del promotor en el 45% de las muestras y el gen *cry1A* en el 35%. No se logró detectar la presencia del gen *epsps* en los alimentos, aun cuando en la soya a granel se detectó en 9 de 10 muestras (González, 2004).

PCR múltiple

Muchos de los productos de PCR para la detección de OGM involucran reacciones que amplifican una sola secuencia blanco. PCR múltiple es una variación de la técnica convencional en donde dos o más secuencias blancos son

simultáneamente amplificadas en la misma reacción. Este método tiene gran fiabilidad, flexibilidad y una reducción de costos (James *et al.*, 2003).

En el caso de una PCR múltiple, lo que se persigue es amplificar simultáneamente, en un solo tubo distintas secuencias específicas, lo cual necesariamente implica que los reactivos mezclados y el programa utilizado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada segmento y no inhibir la identificación de los demás. Con este fin, algunos parámetros, como la concentración de magnesio y de iniciadores, y el tipo y la cantidad de ADN polimerasa, pueden ajustarse experimentalmente. Para otros parámetros, en cambio, debe realizarse un diseño exhaustivo previo (Méndez-Álvarez & Pérez-Roth, 2004). Un sistema múltiple ideal es el que es capaz de detectar las secuencias blanco comunes de OGM (secuencias de promotores, terminadores y/o transgenes), que sea capaz de identificar líneas específicas y que pueda simplificar el proceso de detección e identificación de OGM (James *et al.*, 2003).

Estudios recientes han descrito el uso de PCR múltiple como un ensayo rápido y conveniente para la detección de OGMs. Germini *et al.* (2004a), propusieron un método basado en PCR múltiple para la detección simultánea de 4 tipos de maíz transgénico (MON810, Bt11, Bt176 y GA21), uno para soya (Roundup Ready o RR) y dos controles (el gen *zein* para maíz y el gen *lectin* para soya), en semillas, materia prima y alimentos procesados. En este trabajo se reporta la utilización de 7 pares de iniciadores en la misma reacción, y se observó que la longitud del segmento amplificado fue un factor importante para la detección de ADN transgénico en alimentos procesados. La degradación del ADN durante la elaboración del alimento puede dar a veces falsos negativos. Por esta razón se diseñaron iniciadores que amplificaran segmentos con longitudes no mayores a 270 pb, para la detección de OGM hasta en productos altamente procesados.

Otro caso similar es el reportado por James *et al.* (2003), donde se diseñó un protocolo de PCR múltiple para la detección de los 9 cultivos transgénicos más comunes para la soya (Roundup Ready), maíz (event 176, Bt11, Mon810, T14/25) y canola (GT73, HCN92/28, MS8/RF3, Oxy 235). Se utilizaron combinaciones de iniciadores que permitieran la identificación de líneas específicas. En uno de los sistemas de identificación fue utilizada la amplificación simultánea (simultaneous amplification profiling) en vez de una detección del blanco específico, para la identificación de 4 líneas de maíz GM, la amplificación no específica fue utilizada como una herramienta confiable para la identificación de una línea de maíz GM. El iniciador cry1A 4-3' (antisentido) reconoce dos sitios en el ADN patrón extraído de maíz transgénico evento 176, resultando en la amplificación de productos de 152 pb (esperado) y 485 pb (no esperado). El último fragmento fue secuenciado y se confirmó que era el gen *cry1A(b)*. La amplificación simultánea tiene la habilidad de identificar líneas específicas de GM, así como la identificación de nuevas líneas de OGM que contienen transgenes similares.

Con la finalidad de obtener análisis más eficientes se han propuesto metodologías alternativas, un ejemplo Rudi *et al.* (2003) diseñaron un ensayo basado en PCR múltiple para la cuantificación de ADN. Este método está basado en 2 etapas de PCR, en los primeros ciclos se utilizan iniciadores bipartitas los cuales contienen en la terminación 5' una secuencia universal y en la región 3' una secuencia específica para cada uno de los eventos genéticamente modificados que se analizan. Los iniciadores no utilizados son después degradados con una exonucleasa específica para el ADN de cadena sencilla. La segunda etapa de PCR es realizada conteniendo solo iniciadores complementarios a la secuencia universal de la región 5'. La remoción de los iniciadores es esencial para la PCR cuantitativa. Los oligonucleótidos acoplan a fragmentos internos de los productos de PCR y son después marcados para secuencias

específicas. El acoplamiento de los oligonucleótidos marcados a sus secuencias complementarias en un arreglo de ADN, permite la detección múltiple. Con esta metodología se obtuvo información cuantitativa en un rango de 0.1-2% para los diferentes GM analizados. En este artículo se analizaron 17 diferentes muestras de alimentos y semillas utilizando un sistema de 20-plex para la detección simultánea de siete líneas diferentes de maíz GM (Bt176, Bt11, Mon810, T25, GA21, CBH351 y DBT418).

PCR en Tiempo Real (Rti-PCR)

De acuerdo con las regulaciones europeas, la cuantificación es esencial para el etiquetado de OGM y para cumplir con estas regulaciones hay muchos programas de investigación para el desarrollo de métodos confiables, específicos, estandarizados y cuantitativos para la detección de OGM en alimentos y semillas (Hernández *et al.*, 2004). El uso de PCR en tiempo real es un sistema práctico y rápido como método cuantitativo para la detección de OGM en muestras de alimentos procesados (Ding *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2004). Esta técnica de PCR ha hecho posible cuantificar la cantidad inicial de ácidos nucleicos durante la reacción de PCR sin la necesidad de análisis posteriores (Mason *et al.*, 2002). Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación, la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos (Costa, 2004).

Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en PCR a tiempo real es el SYBR Green

I. Las sondas específicas marcadas con fluorocromos, son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas *molecular beacons* y las sondas FRET (Costa, 2004). Utilizando este método un gen blanco que puede ser cuantificado por la preparación de una curva estándar de cantidades conocidas del gen y por la extrapolación de la línea de regresión. Este sistema requiere iniciadores para el transgen y para el gen de referencia específico (Ding *et al.*, 2004).

Zhang *et al.* (2003), diseñaron un nuevo método de PCR en tiempo real utilizando una sonda adherida a un templado universal. En el diseño, la secuencia del templado universal, es de aproximadamente 20 pb en tamaño y puede complementarse a la sonda para este templado, después el templado es adherido a la región 5' de un iniciador común que es específico a la secuencia que se desea amplificar. La sonda para el templado universal es marcada con un reportero fluorescente en su terminación 5' y con un *quencher* en su extremo 3'. Durante la fase de acoplamiento la sonda universal se une al extremo 5' del templado universal-iniciador de PCR y la terminación 3' de esta se une a la secuencia que será extendida. Debido a la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa la sonda universal acoplada es hidrolizada propiciando la separación del reportero y del quencher y la generación de una señal fluorescente. En este caso el mismo grupo de secuencias universales y de sondas universales puede ser usado para diferentes iniciadores.

Debido a que la soya y el maíz son los cultivos transgénicos más difundidos a nivel mundial se han diseñado ensayos específicos para la detección y cuantificación de residuos de estos cultivos en alimentos. En el 2004 Rott *et al.*, detectaron la presencia de soya RR y determinaron los tipos de

alimentos en los cuales es posible encontrar ADN de soya. En un segundo ensayo cuantificaron la cantidad de soya RR presente en las muestras que dieron positiva en el primer ensayo. En los ensayos cuantitativos se observaron dos grupos: los alimentos con trazas de soya RR ($\leq 0.4\%$) lo que sugiere una contaminación de soya con soya RR y los alimentos con altos niveles de soya RR.

Para el caso del maíz Hernández *et al.* (2004), desarrollaron y compararon 4 sistemas de PCR en tiempo real específicos para la cuantificación de maíz transgénico, con 4 diferentes genes blancos (*adh1*, *hmga*, *ivr1* y *zein*). Los 4 sistemas fueron muy específicos, mostrando una cuantificación muy similar, altamente sensible y exhibiendo los límites de cuantificación por debajo de las 100 copias de ADN. Por lo tanto los 4 métodos son confiables para ser usados como controles de referencia para el análisis de OGMs.

Utilización de Gel de Electroforesis Capilar con Fluorescencia de Láser inducido

Con el incremento de los OGMs que han sido desarrollados para aplicaciones en alimentos, la habilidad de detectar diferentes secuencias transgénicas en una sola reacción se ha convertido en una característica importante en cualquier método de detección (García-Cañas *et al.*, 2002b). Sin embargo, hay una demanda por nuevos métodos analíticos los cuales contribuyan a dar información nueva y confiable para la caracterización de los alimentos transgénicos (García-Cañas *et al.*, 2002a). Muchos de los métodos analíticos propuestos para determinar el contenido de OGM en alimentos están basados en la PCR debido a la sensibilidad, especificidad y aplicabilidad en el análisis de matrices complejas de alimentos. El procedimiento habitual consiste en la separación de los productos de PCR por geles de electroforesis, teñidas con bromuro de etidio, grabando la imagen utilizando un digitalizador de imagen, y la cuantificación de los fragmentos de ADN con un software especializado. Sin embargo

estos procedimientos son poco reproducibles y precisos, requieren grandes cantidades de muestra y mucho tiempo. En resumen la resolución limitada de los geles de electroforesis imponen restricciones en el diseño de estándares internos (García-Cañas *et al.*, 2004a).

El uso en conjunto de PCR y geles de electroforesis capilar (CGE) parece ser una buena alternativa para la detección de organismos transgénicos en alimentos, basados en el análisis de ADN. En combinación con PCR competitiva, el análisis CGE permite la detección precisa de los diversos transgenes amplificados, como una alternativa a PCR en tiempo real. Sin embargo la detección por UV en CGE tiene poca sensibilidad y generalmente no puede ser aplicado en muestras con concentraciones por debajo de 10^{-6} M. El uso de fluorescencia por láser inducido (LIF) en CGE incrementa dramáticamente el límite de detección en comparación con el obtenido con UV (García-Cañas *et al.*, 2002b). Esta técnica involucra un alto nivel de automatización, utiliza mínimas cantidades de muestras y reactivos, es capaz de producir separaciones de productos de PCR con gran eficiencia, y se ha probado que es una buena alternativa para obtener resultados precisos y sensibles en la cuantificación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR (García-Cañas *et al.*, 2004a).

Utilizando geles de electroforesis capilar García-Cañas *et al.* (2002a) detectaron la presencia de maíz transgénico en harina. El método está basado en la extracción y amplificación por PCR de fragmentos específicos de maíz transgénico y el análisis posterior por geles de electroforesis capilar con detección de UV y fluorescencia de láser inducido. Un resultado más sensible fue obtenido con el detector de láser inducido, por ejemplo en una muestra de harina de maíz se mostró una contaminación que no había sido detectada por UV, lo cual hubiera generado un falso positivo.

Para reducir costos y obtener análisis más eficientes se han combinado metodologías, García-

Cañas *et al.* (2004b), diseñaron un método para la detección simultánea de 5 maíces transgénicos utilizando PCR múltiple, seguido de electroforesis capilar por fluorescencia de láser inducido. En este método se utilizó un protocolo de PCR hexaplex para la amplificación de 5 variedades de maíz transgénico (Bt11, T25, MON810, GA21, y Bt176), y se demostró que el uso de geles de electroforesis por fluorescencia de láser inducido es muy útil e informativo para la optimización de parámetros de PCR múltiple como son: el tiempo de extensión, la concentración del buffer de PCR y de los iniciadores. Este método desarrollado es muy sensible y además resuelve los problemas de falsos positivos.

Microarreglos

La tecnología de microarreglos puede incrementar la facilidad y velocidad del análisis de los productos de PCR. Microarreglos de ADN es un sistema analítico que permite la detección simultánea de muchas secuencias de ácidos nucleicos en una muestra. Cada secuencia de ADN es representada por un enlace covalente de una sonda oligonucleótida sobre la superficie modificada de un pedazo de vidrio. Las sondas en el arreglo son hibridadas con el marcador fluorescente para productos de PCR. Un análisis de escáner revela la presencia del material marcado conteniendo las secuencias complementarias de aquellas marcadas en el microarreglo (Germi *et al.* 2004b).

Ácidos Nucleicos Peptídicos (PNAs)

Los ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) son análogos de los oligonucleicos en donde el azúcar-fosfato ha sido reemplazado por la cadena pseudopéptica del monómero N-aminoetilglicina (Germi *et al.*, 2004b). A diferencia de los ácidos nucleicos, los PNAs no contienen pentosas ni grupos fosfato. La principal ventaja de estas moléculas biomiméticas frente a sus análogos naturales es su gran afinidad para establecer enlaces con cadenas de ADN. La falta de repulsión

electrostática entre ellas hace que dichos enlaces sean más fuertes que los existentes entre dos hebras de ADN (González *et al.*, 2005).

Germini *et al.* (2004b), reportaron la combinación de la tecnología de microarreglos con PNAs para la detección de soya genéticamente modificada. Diferentes PNAs fueron diseñados, sintetizados y unidos covalentemente a las superficies funcionales para construir un microarreglo y poder identificar el gen constitutivo lectin y la región del gen correspondiente a Roundup Ready de la soya genéticamente modificada. El efecto de la longitud del PNA en la intensidad de la señal y la especificidad fue evaluado así como las condiciones de detección de los productos de PCR tanto de cadenas simples como dobles. Los mejores resultados se obtuvieron con los productos de PCR de cadena simple y con PNAs largos. Las ventajas de este método encima de otras tecnologías son: los PNAs son más eficientes y forman híbridos más estables que los oligonucleótidos, los PNAs son una secuencia altamente específica y los microarreglos permiten el análisis molecular simultáneo de muchas secuencias.

Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR)

Este método está basado en biosensores capaces de desempeñar un análisis de interacción bioespecífica (BIA biospecific interaction analysis) para el monitoreo de una variedad de reacciones moleculares en tiempo real. Es una técnica óptica que detecta y cuantifica cambios en el índice de refracción en la proximidad de una superficie del chip sensor en el cual los ligandos son inmovilizados, permitiendo la detección de biomoléculas (analitos) interaccionando con el ligando. Si el ligando es una cadena simple de ADN marcado con biotina, la tecnología SPR puede monitorear fácilmente el acoplamiento ADN-ADN en tiempo real (Feriotto *et al.*, 2003).

La resonancia de plasmones superficiales es un fenómeno óptico que ocurre cuando una luz polarizada se dirige desde una capa de mayor

índice de refracción (un prisma) hacia una de menor índice de refracción, que en este caso es una capa metálica, de oro o de plata, que se sitúa entre el prisma y la muestra. La luz que incide en la interfase entre el metal y el prisma provoca la excitación de un plasmon superficial para un determinado ángulo de incidencia de dicha luz, el cual depende fuertemente del índice de refracción del medio colindante a la lámina metálica, por lo que las variaciones que se produzcan en el mismo van a ser detectadas como cambios del ángulo que será proporcional a la concentración. Puede utilizarse también un marcaje con moléculas fluorescentes. Esto presenta como ventaja una mejora en la sensibilidad relativa por la reflexión total interna de fluorescencia. La instrumentación que requiere este tipo de análisis es un sensor, un detector de SPR, software para el control y tratamiento de datos y un sistema para introducir los reactivos y analitos en la superficie del sensor (González *et al.*, 2005).

El análisis de interacción bioespecífica empleando resonancia de plasmones superficiales y tecnologías de biosensor es una propuesta fácil, rápida y automática para la detección de OGMs. Feriotto *et al.* (2002), propusieron una metodología que consiste en la inmovilización del blanco de oligonucleótidos sintéticos de cadena sencilla en el chip sensor y la inyección de la muestra de ADN específico diferente en longitud (Fig. 1A). Este formato es de gran importancia para el estudio de relaciones entre las longitudes de sondas, la eficiencia de la hibridación del ADN blanco y la estabilidad de los híbridos moleculares generados. Un segundo, tercero y cuarto formato son relevantes para propósitos de diagnóstico y están basados en PCR mediante la amplificación de secuencias de los genes que quieren ser identificados. En la Fig. 1B, la PCR se lleva a cabo utilizando un iniciador marcado con biotina inmovilizado en un chip sensor y es analizado por la inyección de un oligonucleótido compatible. En la Fig. 1C las sondas son inmovilizados en el chip sensor y el producto de PCR asimétrico que será analizado se inyecta. En la

Fig. 1D las muestras generadas por PCR son inmovilizadas en el chip sensor y los productos asimétricos que serán analizados se inyectan. En el uso de esta tecnología, tiene mucha importancia el hecho de que no se necesite marcadores

radioactivos, el procedimiento es llevado a cabo en tiempo real, y pequeñas cantidades del ligando y analito son requeridas para obtener resultados.

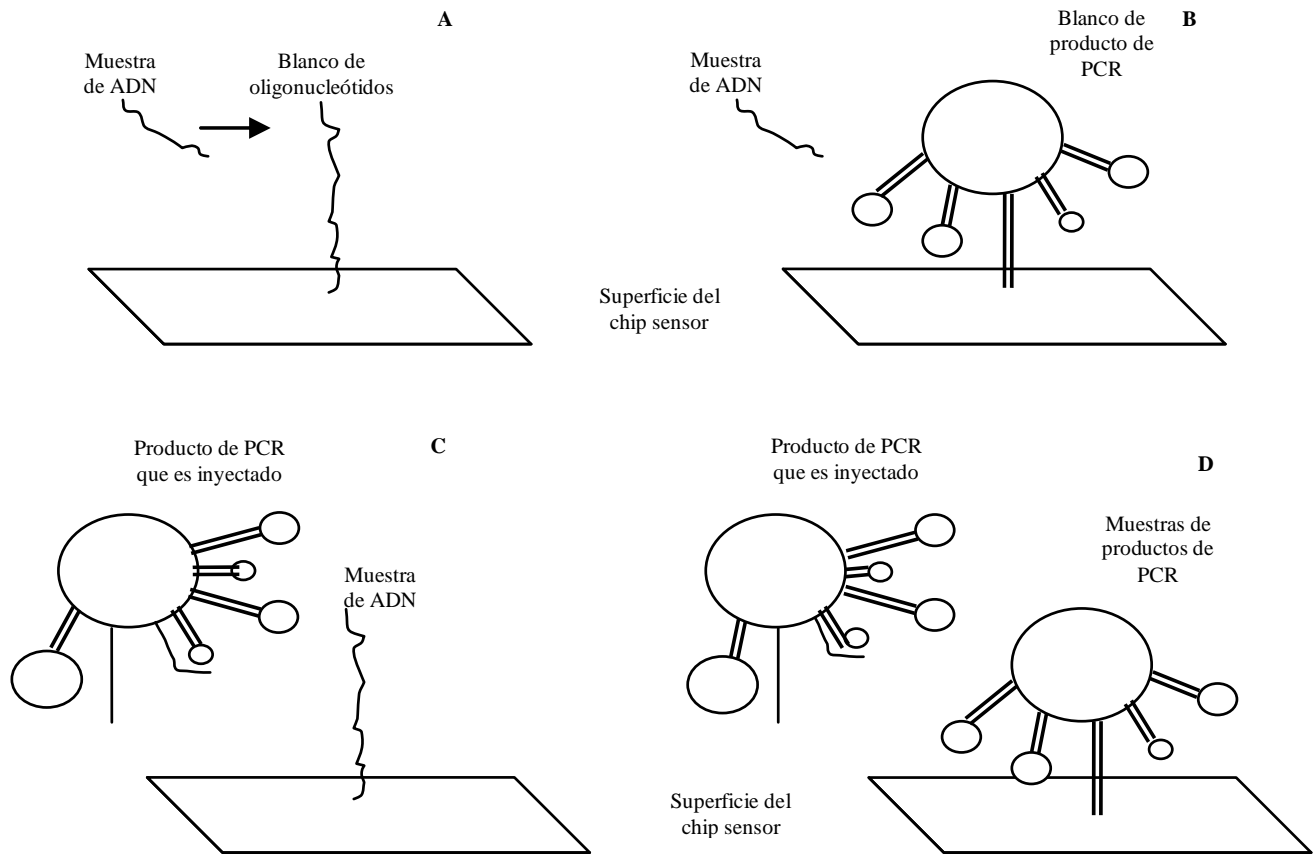


Fig. 1. Estrategias experimentales y formatos para la detección de OGMs utilizando SPR basado en BIA y chip sensores que transportan oligonucleótidos o productos de PCR de lectin o Roundup Ready.

Feriotto *et al.* (2003), diseñaron y realizaron pruebas de un protocolo de SPR basado en un análisis de interacción bioespecífica (BIA) para determinación cuantitativa de OGMs. El protocolo está basado en la inmovilización de los productos de PCR múltiples en un simple chip sensor de flujo celular cubierto de estreptovidina y la inyección de sondas específicas. Los productos zeina marcado con biotina y Bt-176 fueron inmovilizados en el chip sensor SA tomando ventaja de la interacción estreptovidina-biotina. Este protocolo está basado en la inmovilización del producto de PCR múltiple en un chip sensor de flujo celular simple utilizando iniciadores marcados con biotina y la inyección consecutiva de una sonda de nucleótidos compatibles. Para producir la doble cadena de las secuencias del gen blanco, se tiene que llevar a cabo PCR múltiple utilizando ADN genómico patrón con un exceso de iniciadores Bt-R y ZM-R con su respectivo biot-Bt-F y biot-ZM-F marcados con biotina. Esto fue hecho para minimizar la presencia del marcaje con biotina, de los iniciadores no incorporados en la mezcla de PCR. Los productos finales de PCR múltiple zein y Bt-176 fueron purificados con Microcon-30. El análisis en gel de agarosa y la secuenciación directa de los productos de PCR confirmaron la especificidad de la reacción de PCR. Los resultados se compararon con Southern blot y PCR cuantitativo usando ABI Prism 7700.

CONCLUSIONES

El auge que ha creado el desarrollo de nuevas metodologías para la detección de organismos genéticamente modificados se debe a las nuevas regulaciones que existen a nivel mundial para la liberación de alimentos transgénicos. Por lo tanto los laboratorios necesitan desarrollar metodologías de detección más eficaces, las cuales consuman menos tiempo y dinero.

REFERENCIAS

Costa J (2004) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 22: 299-305.

Ding J, Jia J, Yang L, Wen H, Zhang C, Liu W & Zhang D (2004) Validation of a rice specific gene, *sucrose phosphate synthase*, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative PCR detection for transgenes. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3372-3377.

Feriotto G, Borgatti M, Mischiati C, Bianchi N & Gambari R (2002) Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of genetically modified roundup ready soybean gene sequences. *J. Agric. Food Chem.* 50: 955-962.

Feriotto G, Gardenghi S, Bianchi N & Gambari R (2003) Quantitation of Bt-176 maize genomic sequences by surface plasmon resonance-based biospecific interaction analysis of multiplex polymerase chain reaction (PCR). *J. Agric. Food Chem.* 51: 4640-4646.

García-Cañas V, González R & Cifuentes A (2002a) Detection of genetically modified maize by polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis with UV detection and laser induced fluorescence. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1016-1021.

García-Cañas V, González R & Cifuentes A (2002b) Ultrasensitive detection of genetically modified maize DNA by capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence using different fluorescent intercalating dyes. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4497-4502.

García-Cañas V, Cifuentes A & González R (2004a) Quantitation of transgenic Bt event-176 maize using double quantitative competitive polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis laser-induced fluorescent. *Anal. Chem.* 76: 2306-2313.

García-Cañas V, González R & Cifuentes A (2004b) Sensitive and simultaneous analysis of five transgenic maizes using multiplex polymerase chain reaction, capillary gel electrophoresis and laser-induced fluorescence. *Electrophoresis*, 25: 2219-2226.

Germini A, Zanetti A, Salati C, Rossi S, Forre C, Schmid S & Marchelli R (2004a) Development of a seven-target multiplex PCR for the simultaneous detection of transgenic soybean and maize in feeds and foods. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3275-3280.

- Germini A, Mezzelani A, Lesignoli F, Corradini R, Marchelli R, Bordoni R, Consolandi C & Bellis G (2004b) Detection of genetically modified soybean using peptide nucleic acids (PNAs) and microarray technology. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4535-4540.
- González (2004) Detección de genes y proteínas transgénicas en alimentos procesados de soya. Tesis de grado de licenciatura. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila México.
- González V, García E, Ruiz O & Gago L (2005) Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. Informe de Vigilancia Tecnológica. Madrid, España.
www.madrimasd.org/informacionIDI/biblioteca/publicacion/doc/VT/1_vtbiosensores.pdf
- Hernandez M, Duplan M, Berthier G, Vaitilingom M, Hauser W, Freyer R, Pla M & Bertheau Y (2004) Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4632-4637.
- James D, Schmidt A, Wall E, Green M & Masri A (2003) Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean and canola by multiplex PCR analysis. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5829-34.
- Jeng S, Shyu Y & Pan T (2003) Detection of the genetically modified soybeans in processed foods. Food and Fertilizer Technology Center. <http://www.agnet.org/library/abstract/tb161.html>.
- Mason G, Provero P, Veira A M & Accotto G P (2002) Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnol.* 2: 1-10.
- Méndez-Álvarez S & Pérez-Roth E (2004) La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 22: 183-92.
- Rott M, Laerence T, Wall E & Green M (2004) Detection and quantification of roundup ready soy in foods by conventional and real-Time polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5223-5232.
- Rudi K, Rud I & Holck A (2003) A novel multiplex quantitative DNA array based PCR (MQDA-PCR) for quantification of transgenic maize in food and feed. *Nucleic Acids Res.* 31 (20): e62.
- Zhang Y, Zhang D, Li W, Chen J, Peng Y & Cao W (2003) A novel real-time quantitative PCR method using attached universal template probe. *Nucleic Acids Res.* 31 (20): e123.

Enzimas Lipolíticas y su Aplicación en la Industria del Aceite

Crisalejandra Rivera-Pérez, Fernando García-Carreño.
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, A.P. 128,
La Paz, Baja California Sur, 23000, México. E-mail: fgarcia@cibnor.mx*

Palabras clave: interesterificación, lipasas, punto de fusión.

RESUMEN

En los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances que se han visto reflejados en muchas de sus aplicaciones industriales, como en la obtención de productos químicos, en la industria alimentaria y farmacéutica. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos.

Las lipasas microbianas están recibiendo mucha atención debido a su potencial aplicación biotecnológica. Las lipasas constituyen uno de los grupos más importantes de biocatálisis. Las lipasas tienen importantes aplicaciones en la industria alimentaria, como la producción de grasas con propiedades físicas y químicas deseables, además de contener una baja proporción de grasas *trans* en el producto final, a diferencia de los procesos de hidrogenación y transesterificación química.

En este trabajo se describen algunas de las aplicaciones industriales de las lipasas microbianas en la industria del aceite y su potencial empleo en tecnología alimentaria.

Key words: interesterification, lipases, melting point.

ABSTRACT

Recently, biotechnology has experienced great advances, the same as its industrial applications, for instance in obtaining chemical products for nutrition and pharmaceuticals. The number of industrial

processes catalyzed by enzymes is more numerous because they offer a series of advantages over non-biological catalysts.

Microbial lipases are currently receiving much attention because of their biotechnological potential. Lipases constitute the most important group of biocatalysts. One of the applications of lipases is in the food industry with the production of fat with suitable physical and chemical properties, with the smallest proportion of *trans* fats in the end product, unlike processes of hydrogenation and chemical trans esterification.

This work describes various industrial applications of microbial lipases in oil industry and lipases potential in food technology.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son los catalizadores de las reacciones de los sistemas biológicos, cuyas dos principales características son la extrema especificidad y la increíble velocidad de reacción. Los lípidos están envueltos en diferentes procesos biológicos. La estructura de la membrana celular depende de la combinación de ciertas proteínas y lípidos específicos. Las enzimas lipolíticas juegan un rol importante en la movilización de lípidos entre células individuales de los organismos como también en la transferencia de los lípidos de un organismo a otro (Beisson *et al.*, 2000). Los microorganismos han sido la principal fuente de extracción de diversas enzimas.

Sin embargo, pocas enzimas lipolíticas son las que han sido aisladas en forma pura y cristalizadas,

y poco se conoce acerca de su estructura y función.

Las enzimas se usan extensivamente en la industria: proteasas y lipasas se incluyen en detergentes; amilasas y glucosa isomerasas se utilizan en la obtención de jarabes de glucosa o fructosa a partir de maíz. Todas ellas presentan una gran eficiencia cuando son empleadas en la industria (Cheetham, 1995).

Las enzimas microbianas son más usadas que las enzimas derivadas de plantas o animales, por la variedad de actividades catalíticas, la posibilidad de producir grandes cantidades empleando manipulación genética y el rápido crecimiento de los microorganismos. Las enzimas microbianas presentan mayor estabilidad que las enzimas extraídas de plantas y animales; así mismo su producción es más conveniente y segura (Wiseman, 1995).

Las cepas bacterianas son generalmente más usadas ya que las enzimas extraídas de éstas, ofrecen mayor actividad comparada con las levaduras (Frost, 1987), así mismo tienden a tener actividad en un pH neutro o alcalino y son generalmente termoestables. Estas diferencias sobre los pH óptimos de las enzimas son de mayor importancia en el procesamiento de alimentos. Una enzima tiene que tener buena actividad proteolítica a un pH de 4.5 a fin de ser una enzima a prueba de congelación, o a niveles de pH superiores a 5.5 para ser un buen ablandador de carne. Para la mayoría de las aplicaciones prácticas, el pH del alimento no puede ser ajustado como para adecuarlo al pH óptimo de una enzima determinada. La enzima debe escogerse en base a su actividad al pH natural del alimento. La producción de enzimas por bacterias tiene la ventaja de su costo, generalmente menor y por realizarse en un periodo relativamente breve, además los requerimientos nutricionales son simples a diferencia de los organismos superiores. Una de las herramientas que ha contribuido a

obtener una mayor producción de enzimas y otros metabolitos de interés es la manipulación genética, de este modo, procesos de selección, adaptación y mutación han mejorado considerablemente la producción de enzimas a partir de microorganismos (Hasan *et al.*, 2006).

Las lipasas han sido aisladas de una gran variedad de microorganismos, pero una de las primeras fuentes ha sido la especie *Bacillus*, la cual además de la producción de lipasas, produce otras enzimas de interés industrial como son las celulasas, amilasas, elastasas, etc.

HISTORIA DE LAS LIPASAS

La presencia de lipasas ha sido observada desde 1901 en *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* y *B. fluorescens* (Eijkman, 1901), las lipasas producidas por estos microorganismos han sido estudiadas a detalle. Las enzimas encargadas de hidrolizar triglicéridos han sido estudiadas por más de 300 años, pero la habilidad de las lipasas para catalizar la hidrólisis y también sintetizar esteres ha sido reconocido desde hace apenas 70 años (Van Der Walle, 1927).

En 1856, Claude Bernard descubrió una lipasa en el jugo pancreático, él observó que esta enzima hidrolizaba gotas de aceite insoluble y las convertía en productos solubles.

Las lipasas difieren en varias de sus propiedades, éstas dependen de su origen (el cual puede ser fúngico, bacteriano, de mamíferos, etc.), ellas catalizan la hidrólisis o síntesis de una gran variedad de esteres carboxílicos y liberan ácidos orgánicos y glicerol. Todas ellas muestran una alta especificidad sobre los sustratos.

En años recientes, más de 30 lipasas fueron aisladas de cepas de *Rhizopus* y muchas de ellas han sido caracterizadas (Haas & Joerger, 1995). Las lipasas de *Rhizopus* están relacionadas con las lipasas de *Rhizomucor miehei* (existe una homología >55%), éstas tienen una alta especificidad en la posición 1,3 de triglicéridos, las

cuales las hacen muy versátiles en la modificación de lípidos.

GENERALIDADES DE LIPASAS

Las lipasas (E.C. 3.1.1.3) son parte de la familia de las hidrolasas, catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos en la interfase lípido-agua. Además de su rol fisiológico en la hidrólisis de grasas neutras, las lipasas catalizan la hidrólisis o síntesis enantio- y regio-selectiva de una amplia variedad de sustratos naturales tales como soya, aceite de pescado, ricino y frutas cítricas (Björkling *et al.*, 1991), así mismo pueden llevar a cabo la esterificación, interesterificación y transesterificación en medios no acuosos (Houde *et al.*, 2004).

Se ha encontrado que la mayoría de las lipasas comparten una estructura común, un plegamiento de polipéptidos compuesto por 8 láminas β , conectadas por 6 α -hélices (Bornscheuer, 2002). Una importante cualidad de las lipasas es que la triada catalítica Ser-His-Asp/Glu, esta cubierta completamente por una tapa o "lid" que debe estar completamente abierta para acceder al sustrato, esta triada catalítica está embebida en una región consenso Gly-X-Ser-X-Gly (Jaeger *et al.*, 1999).

Las lipasas desarrollan un mecanismo de acción muy singular, llamado activación interfacial, cuando esta lipasa se encuentra en un medio polar, la tapadera o "lid" se encuentra cerrada. Esto provoca que la enzima esté protegida y solamente pueda llegar a actuar en la interfase agua-aceite generada por una emulsión (Akoh *et al.*, 2004). Las lipasas pueden existir en dos formas. En una de ellas, el centro activo de la lipasa está escondido por una cadena polipeptídica que forma la tapa llamada "lid", bajo esta forma la enzima se dice que está inactiva (forma cerrada). En la forma abierta o activa, la cadena polipeptídica se desplaza y el centro activo se expone al medio de reacción. En una solución acuosa, las lipasas pueden existir en equilibrio entre las dos formas. Este intercambio

entre la forma cerrada y abierta de la enzima provista por la interfase agua-aceite, esta acompañada por cambios conformacionales (Sarda, 1958; Dereweda *et al.*, 1992).

Recientemente, se ha demostrado que muchas de las lipasas tienden a formar agregados moleculares, por adsorción de la forma abierta de la lipasa por la hidrofobicidad del centro activo. Estos agregados presentan diferentes propiedades catalíticas cuando se comparan con una molécula individual (Fernández-Lorente, 2003; Palomo, 2003).

LIPASAS EN LA INDUSTRIA

Las enzimas lipolíticas han cobrado gran atención por su potencial aplicación en biotecnología (Benjamín, 1998). Muchas son las aplicaciones que se han encontrado para las lipasas, en la industria del aceite, la producción de farmacéuticos, agroquímicos y componentes aromáticos (Jaeger, 2002).

Algunos de los productos manufacturados con importancia comercial a partir grasas y aceites producidos por lipasas con gran rapidez y una alta especificidad bajo condiciones controladas son los ácidos grasos poliinsaturados y jabones (Hasan *et al.*, 2006). La enantioselectividad se presenta cuando la enzima actúa sobre un sustrato cuyo carbón secundario no es quiral, denominado proquiral, pero se le denomina así, porque al reaccionar da lugar a un centro quiral, de tal forma que es convertido preferentemente en uno de los dos enantiómeros. Esta enantioselectividad de las lipasas es causada por la diferencia de energía libre entre los sustratos y los estados de transición que forma la enzima (Fig. 1). El comportamiento químico-, regio- y enantioselectivo de estas enzimas ha causado gran interés entre científicos e industriales (Saxena, 2003).

Las lipasas son usadas en dos distintos ámbitos. Ellas son usadas en la catálisis para la manufactura

de otros productos (como ingredientes alimentarios) y por sus aplicaciones (producción de químicos).

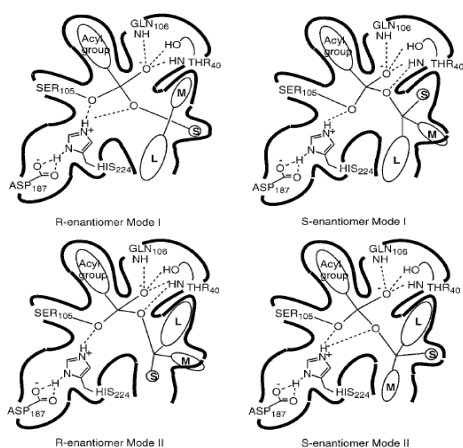


Fig. 1. Formas de los enantiómeros de lipasas (Haefner, 1998).

Dentro de la industria alimentaria, las lipasas, como su nombre lo indica básicamente hidrolizan lípidos produciendo ácidos grasos y glicerol, participan en la acidólisis (reemplazamiento de un ácido graso esterificado por un ácido graso libre), como también en la transesterificación, que consiste en intercambiar el grupo alcoxi (RO-) de un éster por otro alcohol, este tipo de proceso es llevado a cabo para la producción de biodiesel a partir de aceite vegetal o animal. Por otro lado la interesterificación implica el cambio (al azar) de los ácidos grasos en la estructura del glicerol de la grasa en presencia de un catalizador químico, tal como metóxido de sodio o una enzima (lipasa); este proceso se emplea para producir acilgliceroles modificados que no pueden obtenerse mediante química tradicional (Sharma *et al.*, 2001). Así, por ejemplo, se puede alterar el punto de fusión de un aceite modificando la composición y/o estructura de sus triglicéridos mediante esterificación, utilizando como co-sustratos determinados ácidos grasos u otros triglicéridos de diferente composición (Schmid

& Verger, 1998). La mayoría de estas reacciones se llevan a cabo a baja actividad de agua, para prevenir la hidrólisis de los ésteres.

Las principales lipasas de microorganismos (Tabla 1) con interés industrial son producidas por hongos (Bruce *et al.*, 1991), pero muchas de las lipasas son extraídas también de bacterias.

Tabla 1. Organismos empleados para la producción de lipasas.

Organismo	Ácido graso	Posición
<i>Candida cylindracea</i>	AGNE	PNE
<i>Staphylococcus aureus</i>	AGNE	PNE
<i>Aspergillus niger</i>	C:18	1,3-
<i>Candida rugosa</i>	C:18	PNE
<i>Mucor miehei</i>	AGNE	1,3-
<i>Rhizopus arrhizus</i>	C:8, C:10	1,3-
Páncreas porcino	AGNE	PNE

PNE, posición no específica; AGNE, ácido graso no específico (Droge *et al.*, 2000)

Lipasas en la industria de las grasas

Las lipasas han pasado a ser una parte integral en la actual industria alimentaria. Se ha potenciado el uso de enzimas para mejorar procesos químicos tradicionales en la manufactura alimentaria y, las lipasas, se usan actualmente en la producción de una variedad de productos como quesos y alimentos preparados (Ashok *et al.*, 1999)

Las lipasas se han utilizado para la producción de determinados sabores en quesos y otros alimentos por la producción de ácidos grasos volátiles. Dependiendo de la especificidad de las lipasas empleadas pueden liberarse ácidos grasos de cadena corta (C4-C6), que aportan un sabor fuerte y penetrante, o bien pueden liberarse ácidos grasos de cadena larga (>C12), de aspecto más jabonoso, que son metabolizados por los microorganismos presentes en el queso para

producir otros productos aromáticos, como β -cetoácidos (Schmid & Verger, 1998). Algunas grasas presentan más valor que otras por su estructura. Las grasas con menos valor pueden ser convertidas a grasas más útiles mediante métodos químicos, sin embargo los productos generados son inespecíficos, esto es producido por una catálisis aleatoria, es decir que cualquiera de las tres posiciones de una grasa neutra puede ser hidrolizada. Las lipasas pueden catalizar la transesterificación de aceites con bajo valor, para la producción de productos con alto valor comercial, como la mantequilla de cocoa.

Las lipasas también catalizan la transesterificación en solventes orgánicos, esta propiedad permite la producción de una variedad de productos como sustitutos de grasa, diseño de grasas y producción de biodiesel a partir de aceites vegetales (Nakajima *et al.*, 2000). Por otro lado las lipasas obtenidas a partir de *Mucor miehei* (IM 20) y *Candida antarctica* (SP 382) se emplean para la esterificación de ácidos grasos libres en ausencia de solventes orgánicos o transesterificación de metil ester en hexano con isopropildieno glicerol (Akoh, 1993).

La interesterificación y la hidrogenación son técnicas útiles en la preparación de productos para la manufactura de margarinas y mantequillas. En una reacción convencional de interesterificación, esta reacción es llevada a cabo por la presencia de metoxilato de sodio. Sin embargo, la reacción no es selectiva con respecto a la esterificación de un ácido graso en un triglicérido. Por otro lado, el empleo de lipasas para la interesterificación, se lleva a cabo por la presencia de agua para la activación de la lipasa. La presencia de agua causa

la hidrólisis de glicéridos interesterificados sobre acilglicerol específicos.

La lipasa más comúnmente empleada para la industria alimentaria es la 1,3-lipasa de *Rhizomucor miehei*, que esta disponible comercialmente por Novozymes, Biocatalysts y Amano, así mismo se considera una enzima GRAS (Generally Recognised As Safe) por la FDA. (Food and Drug Administration). Empleando esta enzima es posible cambiar los ácidos grasos y modificar las características de la grasa, sin embargo la posición 2 del triglicérido no es tocado (figura 2). La preservación de la posición 2 del triglicérido permite generar una grasa más natural, que puede ser metabolizada por el organismo fácilmente, caso contrario en la interesterificación química, donde todas las posiciones son esterificadas indistintamente (Goh *et al.*, 1993).

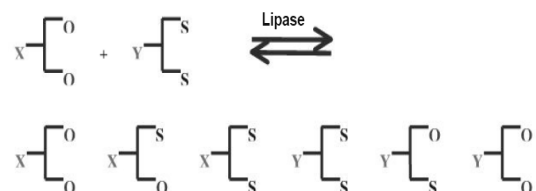


Fig. 2. Interesterificación por 1,3 lipasa. Obtenido de: Husum *et al.*, 2000.

El proceso enzimático es mucho más sencillo que el químico y para este proceso no es necesario emplear un tratamiento posterior. Este efecto de interesterificación de las lipasas sobre los triglicéridos permite modificar el punto de fusión de las grasas (tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la catálisis aleatoria sobre el punto de fusión de algunas grasas.

Grasa	Punto de fusión (°C)	
	Antes	Después
Aceite de soya	-7.4	9.9
Aceite de semilla de algodón	11.5	34
Aceite de coco	26	28.2
Mantequilla de cocoa	34	51

Tomado de: Going, 1967.

La mantequilla de cocoa es un producto de alto valor comercial porque es rico en esteareato, este lípido le permite tener un punto de fusión de 37°C. Esta propiedad le provee características sensoriales deseables por el consumidor. Uno de los ejemplos más conocidos en el empleo de la interesterificación enzimática es la transformación de aceite de palma en un sucedáneo de la manteca de cocoa, componente principal del chocolate (Posorke *et al.*, 1988). El chocolate contiene aproximadamente un 30% de manteca de cocoa, por lo que este proceso es potencialmente interesante para la industria. Esto se hace mediante el empleo de una lipasa específica en la posición 1,3, que actúe sobre el aceite de palma cambiando los ácidos grasos por ácido esteárico.

El proceso de interesterificación resulta en la formación de nuevos triglicéridos, principalmente tripalmitina y diaminoestearina, a partir de aceites de bajo valor comercial, como el aceite de palma. Estos cambios en la composición resultan en modificaciones de las propiedades del aceite, principalmente en el punto de fusión, que cambia de 25.5°C a 36.3°C (Yassin *et al.*, 2003).

Una de las ventajas que tiene el empleo del proceso de interesterificación enzimática, es el empleo de reactores enzimáticos, donde las enzimas están inmovilizadas, el más común dentro

de esta industria es el lecho empaquetado, en continuo y reciclado. La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. Las ventajas de este tipo de reactores es que permite una mayor estabilidad de la enzima, lo que permite disminuir costos (Arroyo, 1998). Este tipo de procesos no requiere más de 70°C para llevar a cabo la interesterificación, a diferencia de la interesterificación química donde la temperatura asciende a 100°C

USO DE LIPASAS TERMOESTABLES

Las enzimas termoestables pueden ser obtenidas de organismo mesófilos y termófilos; se han obtenido algunas enzimas termofílicas a partir de organismos psicrófilos (Imamura, 2000). Los principales organismos de los cuales se han extraído enzimas de interés industrial son hipertermófilos *Pyrococcus furiosus* y *Thermotoga sp* (Adams *et al.*, 1995). Otros organismos como hongos son productores de lipasas termoestables (tabla 3).

La termoestabilidad dentro la biocatálisis tiene varias ventajas, como el manejo de altas temperaturas de operación, lo que permite una alta reactividad, alta estabilidad, alto proceso de producción (incremento de solubilidad de sustratos y productos), baja viscosidad y permite disminuir problemas por contaminación (Mozhaev, 1993).

Tabla 3. Hongos productores de lipasas termoestables

Organismo	T opt. °C	pH opt.
<i>Candida antarctica</i>	70	6.5
<i>Candida curvata</i>	50-60	6.5
<i>Mucor miehei</i>	40	7.0

Las enzimas lipolíticas termoestables han sido aplicadas en la síntesis de biopolímeros y biodiesel, así mismo, han sido usadas para la producción de farmacéuticos, agroquímicos, cosméticos y sabores en la industria alimentaria.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Actualmente, la modificación de grasas y aceites es una de las áreas en la industria del procesamiento de alimentos que demanda atención. El uso de aceite vegetales con triglicéridos importantes y su posterior modificación fisicoquímica tienen un gran potencial en el mercado futuro. El uso de lipasas en la industria ha presentado ventajas considerables sobre los procesos de interesterificación química. El calor requerido es mucho menor, las bajas temperaturas impiden la formación de grasas *trans*, permitiendo así la producción de grasas con menos insaturaciones, los cuales pueden ser obtenidos sin procesos de refinamiento. La obtención de grasas modificadas permite su implementación como aditivos alimentarios, tales como los diacilglicerolos, que son los principales constituyentes de los aceites de cocina. Estos aceites disminuyen el incremento de triglicéridos en la sangre, permitiendo así, prevenir la acumulación de grasas y altos niveles de colesterol en la sangre.

REFERENCIAS

- Adams M, Perler F, Kelly R (1995) Extremozymes: expanding the limits of biocatalyst. *Bio/Technology*, 13: 662-668.
- Akoh CC (1993) Lipase-catalysed synthesis of partial glyceride. *Biotechnol Lett*, 15: 949.
- Akoh CC, Lee GC, Liaw YC, Huang TH, Shaw JF (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Lipid Res*. 43: 534-552.
- Arroyo M (1998) Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39: 23-39.
- Ashok P, Sailas B, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT (1999) The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29: 119-131.
- Beisson F, Arondel V, Verger R (2000) Assaying *Arabidopsis* lipase activity". *Biochem. Soc. Trans.* 28: 773-775.
- Benjamin S, Pandey A (1998) *Candida rugosa* lipase: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast*, 14: 1069-1087.
- Björkling F, Godtfredsen SE, Kira O (1991) The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol.* 9: 360-363.
- Bornscheuer UT (2002) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbial. Rev.* 26: 73-81.
- Bruce LZ, Henrik KN, & Robert LS (1991) Thermostable enzymes for industrial applications. *J. Ind. Microbiol.* 8: 71-82.
- Cheetham PSJ (1995) Principles of industrial biocatalysis and bioprocessing *In: Wiseman A., editor. Handbook of enzyme biotechnology.* UK: Ellis Horwood. pp. 83-234.

- Derewenda ZS, Derewenda U (1992) The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 227: 818-839.
- Dröge MJ, Pries F & Quax WJ (2000) Directed evolution of *Bacillus* lipase. *In: lipases and Lipids: Structure, Function and Biotechnological Applications.* Kokotos, G., Constantinou-Kokotou, V. (eds), pp.169-180.
- Eijkman CU (1901) Enzyme bei bakterien und Schimmelpilzen. *Cbl Bakt Parasitenk Infektionskr*, 29: 841-848.
- Fernández-Lorente G, Palomo JM, Fuentes M, Mateo C, Guisán JM, Fernández-Lafuente R, (2003) Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. *Biotechnol. Bioeng.* 82: 232-237.
- Frost GM, Moss DA (1987) Production of enzyme by fermentation. *In: Biotechnology*, vol. 7a. Rehm HJ & Reed G (eds). Weinheim: Verlag Chemie, pp.65-211.
- Goh SH, Yeong SK & Wang CW (1993) Transesterification of cocoa butter by fungal lipases: effect of solvent on 1,3 specificity. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 70: 567-570.
- Going LH (1967) Interesterification products and processes. *J. Am Oil Chem. Soc.* 44: 414-422.
- Haas MJ, Joerger RD (1995) Lipases of the genera *Rhizopus* and *Rhizomucor*, versatile catalysts in nature and the laboratory. *In: Food Biotechnology: Microorganism.* Khachatourians GG & Hui YH (eds), VCH, Weinheim, pp. 549-588.
- Hæffner F, NT, Hult K (1998) Molecular Modeling of the Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Transesterification Reactions. *Biophys. J.* 74: 1251-1262.
- Hasan Fariha, Ali Shah Aamer, Hameed Abdul (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enz. Microb. Technol.* 39: 235-251.
- Houde A, Kademi A, Leblanc D (2004) Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 118: 155-170.
- Husum TL, Pedersen LS, Nielsen PM, Christensen MW, Kristensen D & Holm (2000) Enzymatic interesterification: process advantages and product benefits. *Palm Oil Develop.* 39: 8-10.
- Imamura S, Kitaura S (2000) Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257, *J. Biochem.*, 127: 419-25.
- Jaeger KE, Dijkstra BW & Reetz MT (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 315-351.
- Jaeger KE & Egger T (2002) Lipases for biotechnology". *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 390-397.
- Mozhaev V (1993) Mechanism-based strategies for protein thermo stabilization. *Trends Biotechnol.* 11: 88-95.
- Nakajima M, Snape J, Khare SK (2000) Method in non-aqueous enzymology *In: Biochemistry.* Gupta MN (ed). Basel: Birkhauser Verlag, pp. 52-69.
- Palomo JM, Fuentes M, Fernández-Lorente G, Mateo C, Guisán JM, Fernández-Lafuente R (2003) General trend of lipase to self-assembly living bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromol.* 4: 1-6.

- Posorke LH, Lefebvre GK, Miller CA, Hansen TT, Glenving BL (1988) Process considerations of continuous fat modification with an immobilized lipase. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 65: 922-926.
- Sarda L, Desnuelle P (1958) Action de la lipase pancréatique sur les esteres en emulsion. *Biochim. Biophys Acta*, 30: 513-521.
- Saxena RK, Sheroan A, Giri B, Davidson WS (2003) Purification strategies for microbial lipases. *J. Microbial Meth.* 52: 1-18.
- Schmid RD & Verger R (1998) Lipases: Interfacial enzymes with atractives application. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 1608-1633.
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19: 627-662.
- Van Der Walle N (1927) Uber synthetische wirkung bakterieller lipasen. *Cbl Bakt Parasitenk Inktionskr*, 70: 369-73.
- Wiseman A (1995) Introduction to principles. *In: Handbook of Enzyme Biotechnology.* 3rd ed. Wiseman A (ed). Padstow, Cornwall, Uk: Ellis Horwood Ltd. T.J. Press Ltd., pp. 3-8.
- Yassin AA, Mohamed IO, Ibrahim MN, Yussof MS (2003) Effect of enzymatic interestification on melting point of palm olein. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 110: 45-52.

REVISTA de la Sociedad Mexicana de

BIO TECNOLOGIA

y Bioingeniería, A.C.



Nueva Era.
Volumen 11, Número 2
Año 2007

Indice

Editorial	2
Instrucciones para los autores	3
Artículos	
Detección de <i>Leifsonia xyli subsp. xyli</i> en Caña de Azúcar (<i>Saccharum spp.</i>), saneamiento mediante técnicas biotecnológicas	8
Estudio de la actividad ácido láctica de <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> y su relación con el perfil de plásmidos durante el almacenamiento en refrigeración	18
Nuevos métodos para la detección de residuos de organismos genéticamente modificados en alimentos basados en el ADN	28
Enzimas Lipolíticas y su aplicación en la industria del aceite	37