

REVISTA de la Sociedad Mexicana de

BioTECNOLOGIA

y Bioingeniería A.C.



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

**Nueva Era.
Volúmen 11, Número 3
Año 2007**

ISSN 0188-4786

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

MESA DIRECTIVA

Dra. Amelia Farrés González Sarabia
Presidenta

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

(CICU-UNAM). Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título04-1999-092518285000-101. Los Conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Del. Tlalpan, México, D.F. Tiraje 500 ejemplares.

BIOTECNOLOGÍA MARINA

México posee una plataforma continental en mares y océanos, que en área es el doble a la parte continental del país. El territorio continental de México abarca 1,972,550 km² y la Zona económica exclusiva, mares, 2,946,825 km². Solamente la zona del Pacífico representa 2,175,325 km². Dos terceras partes de México son aguas marinas. En las aguas oceánicas de Baja California se encuentra una de las siete zonas de más alta productividad pesquera del mundo. En el Golfo de California, además de ser, según Jack Cousteau, el acuario del mundo, se encuentra una poza (chimenea) hidrotermal frente a Guaymas, Sonora. Además en las aguas marinas de México hay esteros, manglares, plataforma continental, aguas oceánicas, y desembocaduras de ríos. Hay aguas templadas y aguas tropicales. Lo único que México no tiene es aguas polares. Hay todos los taxos marinos representados, desde unicelulares hasta mamíferos. Por lo que hay una variedad de metabolismos para explorar. Desgraciadamente, en general, es escasa la información científica sobre los recursos naturales que se encuentran en las aguas marinas. Menor aún es la información generada por investigadores nativos. Igualmente es poco lo que se sabe sobre los organismos que habitan esos nichos ecológicos. El país debe hacer un esfuerzo para invertir en aumentar el conocimiento de los recursos marinos por diversas razones; por saber que hay, como se comporta: biología y ecología, si es posible aprovecharlo para generar riqueza al país (¿biotecnología?), y en la actualidad, muy importante, como conservarlo.

Existen también pocas instituciones dedicadas formalmente a la investigación de organismos marinos con fines biotecnológicos. En la reunión científica "International Marine Biotechnology Conference" se presentan pocos trabajos de Mexicanos.

Hay oportunidad para investigaciones sobre factibilidad biológica que lleven a potenciales biotecnologías. La mayor parte de la biotecnología marina de México está por hacerse. ¿Quién la hará? Hay jóvenes profesionales talentosos que pueden hacer del mar su sitio de muestreo, su caldo de cultivo o su fuente de genes y procesos metabólicos para el desarrollo de biotecnologías.

Dr. Fernando García Carreño
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Mar Bermejo 195. Palo Santa Rita
La Paz, BCS. México 23000
PO Box 128.
Tel +52 612 1238401

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.

La Enfermedad de Alzheimer, Estrategias Terapéuticas

Marcia G. García, Karen Manoutcharian

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México D.F. 04510. E-mail: karman@servidor.unam.mx

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, despliegue en fagos, péptido beta-amiloide

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) representa un gran problema de salud pública que se acrecienta a medida que la población mundial envejece, motivo por el cual es importante el atacar a este problema para poder mejorar la calidad de vida de las personas que lo sufren,

Se ha hipotetizado que la acumulación del péptido beta-amiloide (β A) en el cerebro juega un papel muy importante en la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer por lo que la remoción y desagregación del péptido es una opción terapéutica que está siendo explorada actualmente ya que se han encontrado resultados alentadores en este campo.

Los anticuerpos anti- β A se encuentran dentro de los compuestos capaces de destruir los oligómeros, protofibrillas y fibrillas de β A, así como prevenir su agregación. Estudios *in vivo* han demostrado que los anticuerpos anti- β A tienen la capacidad de eliminar los depósitos preexistentes de β A y/o prevenir el desarrollo de nuevos agregados junto con el mejoramiento de las funciones cognitivas. Sin embargo, los efectos adversos observados con la administración de anticuerpos completos ha llevado a los investigadores a buscar otras opciones, como el uso de los fragmentos de anticuerpos.

La tecnología de “despliegue en fagos” permite la expresión de fragmentos de anticuerpos sobre la superficie de fagos filamentosos, proporcionando un método mucho más práctico y rápido para la obtención de anticuerpos monoclonales.

En nuestro grupo de trabajo, se seleccionó un anticuerpo recombinante (clona b4.4) dirigido contra el péptido β A₁₋₄₂, a partir de una biblioteca humana no inmune de fragmentos de anticuerpos (scFv; cadena sencilla del fragmento variable) creada por el método de despliegue en fagos. También se demostró la capacidad de este fragmento de anticuerpo para inhibir el efecto citotóxico del péptido β A₁₋₄₂ en ensayos *in vitro* utilizando la línea celular SH-SY5Y.

Keywords: Alzheimer's disease, phage display, amyloid beta peptide

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) represents a serious public health problem that increases as the world population grows older, therefore it is very important to attack this problem in order to provide a better life quality for the persons suffering from it.

It's been hypothesized that the accumulation of amyloid beta peptide ($a\beta$) on the brain plays a very important role in the neuropathology of this disease, suggesting the remotion and disaggregation of the peptide as a viable therapeutic option that is being explored nowadays due to the good results found on this field.

Anti- $a\beta$ antibodies are among the compounds capable of destroying the oligomers, protofibrils and fibrils of $a\beta$, preventing their aggregation as well. *In vivo* studies have demonstrated that anti- $a\beta$ antibodies are able to eliminate the preexistent deposits of $a\beta$ and/or prevent the development of new aggregates along with cognitive function improvement. However, the adverse effects observed when complete antibodies were

administered lead the scientists to search for other options such as the use of antibody fragments.

Phage display technology allows the expression of antibody fragments over the surface of filamentous phages, providing a faster and practical method for obtaining monoclonal antibodies.

Our group selected a recombinant antibody (clone b4.4) directed against A β ₁₋₄₂, peptide, from a human native antibody fragment (scFv; single chain fragment variable) library created by phage display. We demonstrated that this antibody fragment has the ability to inhibit A β ₁₋₄₂, peptide's cytotoxicity on *in vitro* assays using the SH-SY5Y cell line.

INTRODUCCIÓN

La neuropatología característica de la enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita por primera vez en 1907 por el Dr. Alois Alzheimer.

La EA es un padecimiento neurológico progresivo que afecta a millones de personas en todo el mundo, siendo una de las causas de demencia más frecuentes después de los sesenta años. Durante su patogénesis, la acumulación de péptido beta-amiloide (β A) en el cerebro y su agregación en placas es un evento muy importante, por lo que se han realizado diversos estudios para encontrar compuestos que disuelvan o inactiven las placas del péptido o que prevengan su agregación.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la incidencia de esta enfermedad es de aproximadamente 20 millones de pacientes en todo el mundo, cifra que en menos de 10 años podría triplicarse si se considera la rapidez con la que aumenta la población mayor (OMS., 2006 www.who.int).

Los países en vías de desarrollo como China, India y la mayor parte de Latinoamérica conforman actualmente más del 50% de las personas con la enfermedad de Alzheimer y se estima que para el 2025 aumentará la tasa de crecimiento de enfermos de Alzheimer concentrándose en estos países

aproximadamente el 70% de los afectados de todo el mundo. Se sabe que el 5% de los hombres y el 6% de las mujeres que han cumplido los 60 años presentan la enfermedad, mientras que el 25-50% de las personas a partir de los 85 años tienen un cuadro sintomático de Alzheimer, además de que un número mayor presenta alguno de los patrones patológicos sin manifestación de síntomas (OMS, 2006). Los problemas individuales y el enorme costo para la sociedad han incrementado la preocupación por esta enfermedad (Fassbender *et al.*, 2001).

La EA tiene como consecuencia la pérdida irreversible de neuronas, particularmente en la corteza, el hipocampo, el sistema límbico y los ganglios basales. Se manifiesta inicialmente por afectar levemente las funciones cognitivas como pérdida de la memoria episódica de corto plazo y la orientación en tiempo y espacio. Posteriormente se presenta una pérdida creciente y progresiva de la memoria, de juicio, de toma de decisiones, de orientación espacial y de lenguaje. Después de una década o más se manifiesta una demencia marcada, desorientación e inmovilidad total hasta la muerte por fallo cardiorrespiratorio, siendo considerada una causa frecuente de muerte en personas adultas de entre 55 a 65 años (Larson *et al.*, 2004). Sus características patológicas son la pérdida neuronal, la presencia de placas seniles extracelulares conformadas por el péptido beta-amiloide (también llamadas placas neuríticas), conglomerados neurofibrilares y anomalías neuroquímicas (Nussbaum *et al.*, 2003; Dugué *et al.*, 2003; Shastri, 2003). Se denomina β A a aquellas proteínas con estructura secundaria de láminas β que se tiñen con rojo congo o con tioflavina S (Klein *et al.*, 2001).

Las placas neuríticas son lesiones multicelulares esféricas que contienen depósitos extracelulares de péptido β A en su mayor parte en forma fibrilar. Están rodeadas de axones degenerados y dendritas distróficas, células de microglía activadas y astrositos reactivos (Maimone *et al.*, 2001). La

densidad amiloide del centro de cada placa se ha relacionado con el estadio de formación de la placa, desde las recién formadas con un centro muy difuso, hasta las placas terminales con un centro denso (Vickers *et al.*, 2000).

El péptido β A de las placas neuríticas es un producto del metabolismo normal de una glicoproteína transmembranal llamada proteína precursora del amiloide (APP). Existen dos vías principales para el procesamiento de la APP: Por actividad de una α secretasa se libera el ectodominio sAPP α N-terminal y se produce un fragmento C-terminal de 83 residuos de aminoácidos (C83) que es transmembranal. Posteriormente una actividad γ secretasa produce el fragmento P3 que es una forma N-terminal truncada del péptido β A. Por otro lado, la actividad de β secretasa libera el ectodominio sAPP β N-terminal produciendo un fragmento C-terminal transmembranal de 99 residuos de aminoácidos (C99). La actividad γ secretasa produce el péptido β A de diferentes tamaños: de 39 a 43 aminoácidos (Wolfe, 2002; Irizarry, 2001).

Recientemente se ha postulado que el procesamiento anormal de la APP debido a mutaciones en su secuencia, conducen a la EA en algunas familias (Winblad, 2003; Wolfe, 2002; Hardy *et al.*, 2002). Los datos obtenidos del estudio de mutaciones poco frecuentes en familias con desarrollo temprano de la EA se ha utilizado para identificar blancos terapéuticos y para crear modelos animales (Nussbaum *et al.*, 2003).

A la fecha hay evidencias importantes que indican que la variabilidad genética en el catabolismo del péptido β A y su remoción pueden contribuir al riesgo de desarrollo temprano de la EA (Irizarry, 2001). Sin embargo, cada vez más reportes sugieren que la acumulación masiva del péptido beta-amiloide de 42 aminoácidos (β A42) en fibrillas, es un evento primario en la patogénesis de la EA (Ardí *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista genético, la EA es dicotómica, puede ser de desarrollo temprano

cuando hay mutaciones persistentes que se transmiten de manera autosomal, o puede ser de desarrollo tardío debido a polimorfismos comunes (Tanzi *et al.*, 2001).

Se ha postulado que las placas neuríticas presentan neurotoxicidad que conduce a la muerte celular y en algunos estudios se han correlacionado la densidad de las placas, y no el número de ellas, con las características clínicas de la EA (Dugué *et al.*, 2003; Ardí *et al.*, 2002), sin embargo, no se ha encontrado correlación. Se ha propuesto que el incremento de especies de oxígeno reactivo y algunos metales como el hierro o el aluminio contribuyen a la degeneración neuronal (Shastri, 2003). Adicionalmente, se han identificado algunos derivados del nitrógeno, enzimas proteolíticas y citocinas inflamatorias en los procesos de neurodegeneración en la EA (Fassbender *et al.*, 2001; Vickers *et al.*, 2000).

Debido a que el péptido β A esta asociado a la EA, las proteasas que lo generan son de gran interés para el desarrollo de compuestos con potencial terapéutico (Ardí *et al.*, 2002). La β secretasa ha sido clonada y se han desarrollado inhibidores para ella (Ardí *et al.*, 2002; Dugué *et al.*, 2003; Shastri, 2003). Así mismo, recientemente se ha logrado identificar la γ secretasa y se han desarrollado tanto inhibidores como moduladores de su actividad (Wolfe, 2002; Citron, 2002). Sin embargo, estos inhibidores secundarios pueden tener efectos sobre la función normal de las proteasas mencionadas.

Teniendo en cuenta esta desventaja, resultan de interés otros compuestos que puedan desagregar los depósitos amiloides y/o prevenir la formación de oligómeros y fibrillas de péptido β A (Irizarry *et al.*, 2001).

Se ha encontrado que las fibrillas de péptido β A no son las únicas formas neurotóxicas, sino que también se ensamblan en formas solubles (protofibrillas), formando estructuras curvilíneas de 4-11 nm en diámetro y menos de 200 nm de longitud. Las protofibrillas causan estrés oxidativo *in*

vitro, al desacoplar los transportadores iónicos y de glucosa en la membrana celular, lo cual genera desestabilización de la homeostasis celular del calcio. También causan cambios electrofisiológicos lo que eventualmente conduce a la muerte neuronal. Además de las protofibrillas, algunos oligómeros pequeños llamados ligandos difusibles de βA (ADDL), son neurotóxicos *in vitro*. Ambas formas escapan a la detección con anticuerpos dirigidos a las fibrillas del péptido βA (Klein *et al.*, 2001).

El depósito de formas insolubles del péptido βA en estructuras similares a placas da como resultado daño estructural en los axones. Las neuronas responden con cambios locales en el sitio del daño con mecanismos de adaptación o regeneración pero en la EA estos resultan ineficientes debido al fuerte estrés mecánico generado por las placas más compactas del péptido βA (Vickers *et al.*, 2000).

Es claro que el depósito de péptido βA en el cerebro es un evento relacionado con la edad y existe evidencia que indica que la formación de placas en cierto grado, es inevitable con la edad. (Maimone *et al.*, 2001).

Los oligómeros del péptido βA soluble representan micelas de proteínas porque el péptido βA es anfipático y reactivo en su superficie, la formación de oligómeros es dependiente de una concentración crítica y su formación se correlaciona con la aparición de un ambiente hidrofóbico. Se ha observado que los oligómeros solubles son neurotóxicos y se han encontrado en el cerebro de pacientes con la EA. Se ha sugerido que estos oligómeros no se acumulan con el tiempo pero pueden servir como núcleos para desarrollar estructuras fibrilares (Kayad *et al.*, 2003).

En un paciente típico con EA hay una población mixta de oligómeros de péptido βA y placas neuríticas maduras. Estos oligómeros pueden permanecer como moléculas solubles e interactuar destructivamente con las neuronas. Se han hecho estudios estructurales para identificar los

mecanismos por los que estos oligómeros son importantes en la patogénesis de la EA con miras a desarrollar estrategias inhibitoras (Jackson *et al.*, 2000).

Las dos formas predominantes del péptido βA en la enfermedad de Alzheimer son el fragmento $\beta A40$, el más abundante en circulación y con mayor solubilidad, así como el fragmento $\beta A42$, menos soluble y considerado el más tóxico y que se encuentra en mayor cantidad en las placas seniles. Se ha observado que las suspensiones del péptido $\beta A42$ son igualmente tóxicas a las del péptido $\beta A40$. Sin embargo, el péptido $\beta A42$ presenta una cinética de agregación extremadamente rápida respecto del péptido $\beta A40$. (El-Agnaf *et al.*, 2000).

Existe evidencia que apoya que no es el depósito de péptido βA lo que desencadena la EA, si no más bien la agregación del péptido. Aunado a esto, se han encontrado factores especie-específicos y relacionados a la edad, que modulan la toxicidad del péptido βA .

Los estudios en modelos transgénicos de la EA y en muestras de pacientes, han demostrado que los depósitos de péptido βA más grandes y densos están asociados a la pérdida neuronal y que no existe una penumbra de toxicidad sino que se comportan como lesiones tóxicas focalizadas. Se ha comprobado que los depósitos de péptido βA tienen una conformación de lámina β -plegada relevante para la toxicidad *in vivo*, por lo que la prevención o remoción de depósitos de péptidos son estrategias terapéuticas potenciales (Urbanc *et al.*, 2002).

La relación entre la neurotoxicidad del péptido βA y la APP no es clara, pero es posible que la APP pueda modular la toxicidad del péptido βA . La formación de fibrillas del péptido βA convierte al mismo péptido βA en una forma con alta afinidad por proteínas de membrana de las neuronas y particularmente por la APP. En contraste, los agregados amorfos de péptido βA no muestran unión a proteínas de membrana, este resultado

correlaciona bien con la ausencia de toxicidad. Existen varios mecanismos por los que APP promueve la muerte celular, pero los resultados experimentales sugieren que la unión de APP y β A aumenta la toxicidad por cambios conformacionales que disparan la muerte celular (Lorenzo *et al.*, 2000).

ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

Considerando la hipótesis de la cascada amiloide, se han desarrollado estrategias mediante inmunoterapia que incluyen la inhibición de secretasas, neuroprotección por reducción de la producción del péptido β A, la búsqueda de compuestos que puedan potenciar la inhibición de la agregación del péptido β A y/o promoción de su remoción. Algunos de estos compuestos son anticuerpos anti- β A que se pueden unir a las placas seniles y desagregarlas (Solomon *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que estos anticuerpos anti- β A pueden desagregar las placas y también revertir el daño neuronal, por un mecanismo aún no descrito (Lombardo, 2003); la administración periférica de anticuerpos anti- β A monoclonales reducen la formación de placas en cerebros de ratones PDAPP y restauran la memoria y la capacidad de aprendizaje (Bard *et al.*, 2000), todo esto ha demostrado que la inmunización pasiva puede interferir con los procesos de desagregación de las placas seniles. Por otra parte, se ha observado que la presencia de fragmentos Fc de los anticuerpos, puede desencadenar una respuesta inmune innata en el cerebro, provocando inflamación crónica, pérdida neuronal y elevada secreción del péptido β A, afectando el balance entre la agregación y desagregación de las placas (Broytman *et al.*, 2004).

Como parte de la prueba multicéntrica para la vacuna AN1792 en pacientes con EA en grado medio o moderado, en treinta pacientes se probó una inmunización activa con péptido sintético β A₁₋₄₂ pre-agregado, mediante una inyección intramuscular y un refuerzo a las cuatro semanas.

Se obtuvo suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) y se encontró que los anticuerpos anti- β A generados en respuesta a la vacunación, no tienen reacción cruzada con el ectodominio de la proteína APP en la superficie celular y son específicos a depósitos de péptido β A (Hock *et al.*, 2002). Los anticuerpos también fueron encontrados en LCR, lo que demuestra su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica. Por otro lado, se encontró la estabilización cognitiva relevante en la vida diaria de los pacientes que presentaron anticuerpos contra placas de péptido β A (Hock *et al.*, 2003). Estos datos sugieren que los anticuerpos contra placas de péptido β A pueden detener o retardar el deterioro clínico y cognitivo en pacientes con la EA.

Sin embargo, en enero de 2002 fue suspendida la prueba clínica con AN-1792 debido a que algunos pacientes presentaban inflamación en el sistema nervioso central. El fármaco probado (Betabloc), contenía una versión sintética del péptido β A y causaba que el sistema inmune atacara las placas neuríticas. Sin embargo, se sugirió una posible respuesta autoinmune porque la APP se encuentra en muchas células normales incluyendo las neuronas (Washington, 2000).

En la prueba clínica con AN-1792, posiblemente los anticuerpos se unieron a las placas neuríticas y se dio una condición de inflamación crónica como una respuesta aguda para acelerar la remoción del péptido β A en el cerebro. En pacientes de edad avanzada, la vacunación tiene el potencial de exacerbar la neuroinflamación, a través de la invasión al cerebro de células T-citotóxicas que acelerarían la pérdida neuronal y la demencia.

Debido a esto, se ha intentado optimizar un protocolo de inmunización utilizando únicamente los fragmentos de inmunoglobulinas que interactúen específicamente con el péptido β A como los fragmentos F(ab')₂ que fueron tan efectivos como la administración del anticuerpo completo (Bacskai *et al.*, 2002). Estos anticuerpos, reconocen la región amino terminal del péptido β A (EFRH), pero se ha demostrado que cuando son dirigidos al extremo

amino terminal del péptido β A se asocian a hemorragias cerebrales en ratones transgénicos APP23 (Pfeifer *et al.*, 2002).

En 1993, se aislaron cuatro anticuerpos reactivos simultáneamente contra placas de péptido β A40 y vasos sanguíneos cerebrovasculares, de un paciente con diagnóstico clínico de la EA. Dos de estos anticuerpos, mostraron reactividad contra placas en cerebros de personas sanas y los cuatro anticuerpos obtenidos, reaccionaron también con neuronas en cerebros de pacientes con EA y personas sanas. Se exploró el epítipo reactivo, encontrándolo en la región amino terminal entre los residuos 1-28 (Gaskin *et al.*, 1993).

En 1996 se probaron algunos anticuerpos monoclonales para prevenir la agregación del péptido β A. Se encontró que el anticuerpo monoclonal AMY-33, que reconocía un epítipo entre los residuos 1-28 del péptido β A40, inhibía la agregación del péptido en presencia de heparan sulfato. Lo que indica que el efecto inhibitor parecía estar relacionado con la localización del sitio de unión del anticuerpo, y con la naturaleza de los agentes agregantes (Solomon *et al.*, 1996).

Posteriormente, en 1997 se demostró que el anticuerpo monoclonal 6C6, que se une al epítipo localizado entre los residuos 1-16 tiene un efecto de solubilización significativo en fibrillas pre formadas del péptido β A, y confiere deterioro a las estructuras de las fibrillas. Este anticuerpo monoclonal previene la neurotoxicidad del péptido β A *in Vitro*, de manera dependiente de la concentración, lo que sugirió que los anticuerpos monoclonales de alta afinidad dirigidos a sitios específicos, podrían revertir la agregación patológica del péptido β A a componentes no tóxicos (Solomon *et al.*, 1997).

Se han desarrollado varios ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína humana APP. En 1999 se inmunizaron ratones transgénicos PDAPP con péptido β A42. La inmunización en animales jóvenes, esencialmente previene el desarrollo de la formación de placas de péptido β A, la distrofia neurítica y la astrogliosis. También se demostró que

el tratamiento en animales envejecidos también reduce la extensión y progresión de las neuropatías que se presentan en la EA, que se presentarían sin tratamiento. Se hizo patente que la inmunización con péptido β A42 genera anticuerpos específicos anti- β A (Schenk *et al.*, 1999).

Ya que la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el péptido β A, ha sido útil en el tratamiento de los signos y síntomas en modelos animales *in vitro*, es fácil plantearse el uso de fagos filamentosos que presentan fusiones de polipéptidos a sus proteínas de superficie como método de producción de moléculas que se unan al β A, tomando en cuenta las ventajas que confiere esta tecnología en la producción de monoclonales.

También se ha demostrado que el empleo de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), puede desagregar las placas seniles (Frenkel *et al.*, 2000). Considerando esta premisa, se han desarrollado bibliotecas de scFv tanto inmunes (de ratón), como no inmunes (de humano) a partir de las cuales ha sido posible encontrar anticuerpos dirigidos a diferentes regiones del péptido β A (Manoutcharian *et al.*, 2003; Manoutcharian *et al.*, 2004).

Se ha discutido ampliamente sobre si la inmunización pasiva es suficiente para que los anticuerpos anti-péptido β A, atraviesen la barrera hematoencefálica y entren al sistema nervioso central (SNC). Un grupo de investigación, no logró detectar anticuerpos en las placas seniles (Bard *et al.*, 2000) pero otro grupo si lo hizo (Morgan *et al.*, 2000). La única diferencia entre ambos es la vía de administración del anticuerpo, intravenosa en el primer caso, e intraperitoneal en el segundo. Resulta posible que la forma de administración podría influir en la capacidad de los anticuerpos de atravesar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, también es concebible que los anticuerpos actúen como "precipitantes periféricos de péptido β A" por lo que aun se requiere de más estudios del tema para vislumbrar la manera en que actúa la inmunoterapia anti-péptido β A (Lee, 2001).

Sin embargo, el uso de anticuerpos como agentes terapéuticos o de inmunodetección tiene aplicaciones limitadas debido a su alto costo y a sus características de estabilidad. Es por eso que hoy día se prefieren moléculas con la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo, pero que no tengan una base de inmunoglobulina. Para cubrir estos requisitos se emplean péptidos o fragmentos de anticuerpos (con los sitios de unión al antígeno), expresados en fagos mediante una tecnología conocida como despliegue en fagos (phage display), desarrollada por primera vez en el bacteriófago M13 por el Dr. James Smith en 1985, a partir de entonces se han desarrollado numerosos sistemas de expresión tanto *in vitro* como *in vivo*. La posibilidad de expresar proteínas en la superficie de bacteriófagos mediante el despliegue en fagos establece un vínculo entre su fenotipo y genotipo.

El despliegue en fagos es una tecnología que permite la expresión de uno, o un conjunto de péptidos o proteínas fusionados a una de las proteínas de la cubierta del bacteriófago, resultando en un desplegado de la fusión proteica sobre la superficie del virión (McCafferty *et al.*, 1990). Al mismo tiempo, el ADN que codifica tal fusión se encuentra dentro del virión que lo expresa (Whitlow *et al.*, 1991).

El despliegue en fagos ha sido usado para crear una unión física entre una vasta biblioteca de secuencias peptídicas aleatorias y ADN's que codifican para dichos péptidos, permitiendo una rápida identificación de ligandos peptídicos para una variedad de moléculas blanco (anticuerpos, enzimas, receptores celulares, etc.), por un proceso de selección *in vitro* llamado bioselección (biopanning).

Se han usado bibliotecas peptídicas aleatorias desplegadas sobre los fagos en un gran número de aplicaciones, como el mapeo de epítomos, el mapeo de interacciones proteína-proteína, la identificación de ligandos no peptídicos, péptidos activos y sustratos de proteasas, entre otras (Batra *et al.*, 1990).

Los anticuerpos desplegados son inmunoterapéuticos muy confiables, fáciles de producir, bien tolerados y de buen comportamiento clínico. Mediante el rearrreglo de los dominios variables y bioselección de anticuerpos de ratón, se puede generar una versión humana con características similares de afinidad, o bien se puede aplicar el proceso de humanización (Hoogenboom *et al.*, 2000).

La fuente de los dominios de los genes variables y los tipos de CDR's incluidos determinarán la especificidad y frecuencia de clonas específicas a un antígeno de interés, como la calidad (afinidad y frecuencia de mutaciones de nucleótidos) de las clonas seleccionadas. Los anticuerpos altamente afines a un antígeno se pueden seleccionar más fácilmente a partir de bibliotecas inmunes, mientras que las bibliotecas sintéticas y no inmunes son útiles como fuentes de anticuerpos a muchos diferentes antígenos. El formato de expresión también influye en los resultados de la selección, por lo que se prefiere utilizar la fusión a cpIII en fagémidos, porque permite una alta frecuencia de expresión monovalente y la fácil conversión de anticuerpos expresados en fagos a anticuerpos solubles secretados (Hoogenboom *et al.*, 2000).

Los sistemas de fagémidos permiten la expresión de polipéptidos que no pueden ser expresados en sistemas de expresión simple, debido a que los efectos deletéreos de las proteínas de fusión son atenuados por la presencia de proteínas de envoltura del fago ayudador de tipo silvestre. Por eso, actualmente se ha logrado la expresión funcional de polipéptidos en las cinco proteínas de envoltura del fago mediante sistemas fagémidos. A la fecha existen reportes que demuestran que la envoltura del fago es extremadamente tolerante a la adición de nuevas proteínas y estas proteínas pueden ser específicamente modificadas para mejorar el despliegue en los fagos.

Existen bibliotecas de péptidos expresadas en fagos que pueden ser usadas para aislar péptidos

que se unen con alta especificidad y afinidad a prácticamente cualquier proteína de interés. Estos péptidos pueden ser utilizados como reactivos para entender el reconocimiento molecular, o como moléculas para el diseño de fármacos. En este contexto se ha demostrado que muchos péptidos identificados mediante bibliotecas en fagos, se unen a estructuras tridimensionales biológicamente relevantes por lo que han sido utilizados para identificar nuevos sitios para el diseño de inhibidores enzimáticos.

Una de las ventajas de usar M13 como sistema, es que se puede obtener el ADN en dos formas, dependiendo de lo que se necesite. Puede obtenerse ADN de una sola cadena para secuenciar a partir de los fagos, o bien ADN de doble cadena tipo plásmido a partir de las células infectadas (Messing, 1991). Recientemente se ha desarrollado un sistema de vector llamado fagémido, el cual combina las ventajas de los vectores plasmídicos y de fago. El fagémido posee los orígenes de replicación de M13 (de cadena sencilla) y del plásmido (de doble cadena).

Los fagémidos pueden cultivarse como plásmidos o como fagos recombinantes con la ayuda de un fago *helper* como M13KO7, ya que a pesar de que el fagémido tiene el origen de replicación de M13, le hacen falta los genes de las proteínas del fago que se requieren para poder producir una partícula viral completa. Por lo tanto, las células transformadas con el fagémido deben ser infectadas con un fago *helper* que codifique para las proteínas necesarias para replicar y empaquetar el ADN de cadena sencilla del fagémido, en partículas de M13 (rescate de fago). La presencia de un marcador de resistencia como la ampicilina en el fagémido, hace posible la selección de las células transformadas en un medio que contiene antibiótico.

McCafferty *et al.* (1990) mostraron que los fragmentos de anticuerpo podían ser expresados en la superficie de partículas de fago mediante la fusión de los genes variables de los anticuerpos a

una de las proteínas del fago. Los anticuerpos expresados en fagos que son específicos para un antígeno de interés, pueden ser enriquecidos posteriormente por múltiples rondas de selección por afinidad (al antígeno), debido a que la partícula del fago lleva el gen que codifica para el anticuerpo expresado. Esto se reportó por primera vez por McCafferty *et al.* (1990), para fragmentos de anticuerpos scFv. Esta aplicación consiste en expresar fragmentos de anticuerpos scFv como proteínas de fusión desplegadas en la superficie de fagos filamentosos, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cual los genes de las regiones variables (V) de las inmunoglobulinas se amplifican a partir de hibridomas o de células de bazo. Los genes de la fracción variable pesada (VH) y de la ligera (VL) se clonan en un vector de fago y se expresan fusionados a una proteína de superficie del fago.

Cada genoma de fago recombinante contiene los genes V que determinan la secuencia de aminoácidos de los CDR del anticuerpo que se expresará en su superficie. Dado que la región del anticuerpo desplegado mantiene su capacidad de unión al antígeno, es posible enriquecer los fagos recombinantes que expresen anticuerpos específicos por medio de selección por afinidad. De esta manera, los anticuerpos de una afinidad y especificidad determinada pueden seleccionarse a partir de una población.

La tecnología de expresión de scFv's en fagos recombinantes tiene el poder y la versatilidad de mimetizar las características de la diversidad y selección inmune *in vivo*. Se prevé que en un futuro podrán sustituirse las prácticas de inmunizar animales y el desarrollo de hibridomas, por un sistema bacteriano capaz de sintetizar y expresar cantidades de anticuerpos virtualmente ilimitadas para prácticamente cualquier antígeno.

Casi todas las proteínas scFv contienen un *linker* de 15 aminoácidos (Gly4Ser)₃. Este péptido *linker* flexible se diseña específicamente para poder unir el espacio de 3.5 nm que existe entre el

carboxilo terminal de la cadena VH y el amino terminal de la cadena VL. Esta construcción facilita el acoplamiento de la cadena y minimiza problemas de recircularización y agregación que se presentan cuando las dos cadenas se expresan de manera individual. La afinidad y estabilidad de los anticuerpos scFv que contienen los residuos (Gly4Ser)₃ son generalmente comparables con los de un anticuerpo nativo.

Cuando los anticuerpos recombinantes se unen al antígeno, unen eficazmente al fago también. La presencia de fago unido a antígeno es por lo tanto un indicador indirecto de que los anticuerpos reactivos al antígeno se expresan en la punta. Este fago por si mismo puede ser detectado con un anticuerpo marcado contra la proteína de superficie cpVIII. Ya que esta proteína de cobertura se presenta en varios miles de copias en la superficie del fago, ésta amplifica eficazmente la señal.

En nuestro grupo de trabajo, se seleccionó un anticuerpo recombinante (clona b4.4) dirigido contra el péptido βA_{1-42} , a partir de una biblioteca humana no inmune de fragmentos de anticuerpos (scFv; cadena sencilla del fragmento variable), creada por el método de despliegue en fagos. También se demostró la capacidad de este fragmento de anticuerpo para inhibir el efecto citotóxico del péptido βA_{1-42} en ensayos *in vitro*, utilizando la línea celular SH-SY5Y. Dicha clona (b4.4), expresa el fragmento de anticuerpo en fusión a la proteína cpIII del fago filamentoso M13 (de 3 a 5 copias en el fago). Con el antecedente de los resultados neuroprotectores que presenta la clona, se llevó a cabo una subclonación para expresar el fragmento recombinante en un alto número de copias, la clona construida respondió de manera favorable, potenciando el reconocimiento hacia el péptido βA_{1-42} y demostrando también una capacidad neuroprotectora, siendo este un resultado bastante alentador, ya que se obtuvo una molécula que a largo plazo puede constituir una opción terapéutica barata y de rápida obtención, dadas las ventajas que el despliegue en fagos proporciona.

REFERENCIAS

- Backsai F, Kajdasz S, McLellan M, Games D, Seubert P, Schenk D & Hyman B (2002) Non Fc-mediated mechanisms are involved in clearance of A β in vivo by immunotherapy. *J. Neurosci.* 22: 7873-7878.
- Bard F, Barbour R, Cannon C, Carretto R, Fox M, Games D, Grajeda H, Guido T, Hoenow K, Hu K, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee C, Lee M, Motter R, Nguyen M, Vasquez N, Seubert P, Yednock T, Selkoe D, Burke R, Grajeda H, Huang J, Lieberburg I, Soriano F, Weiss K, Welch B, Mutter L & Yednock T (2000) Peripherally administered antibodies against A β peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.* 6: 916-919.
- Batra JK, FitzGerald D, Gately M, Chaudhary VK & Pastan I (1990) Anti-Tac(Fv)-PE40, a single chain antibody Pseudomonas fusion protein directed at interleukin 2 receptor bearing cells. *J Biol Chem.* 265: 15198-15202.
- Broytman Oleg & Malter James S (2004) Anti -A β : The good, the bad and the unforeseen; *J. Neurosc. Res.* 75: 301-306.
- Citron M (2004) Strategies for disease modification in alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 667-685.
- Citron M (2002) Alzheimer's disease: treatments in discovery and development. *Nat. Neurosci.* 5; 1055-1057.
- Dugué M, Neugroschl J, Sewell M & Martin D (2003) Review of dementia. *Mt. Sinai J. Med.* 70: 45-53.
- El-Agnaf O, Guthrie D, Walsh D, Irvine B (1998) The influence central containing residues 19-25 on the aggregation properties and secondary structure of Alzheimer's β -amyloid peptide. *Eur. J. Biochem.* 256: 560-569.
- Fassbender, K, Masters C & Beyreuther K (2001) Alzheimer's disease: molecular concepts and therapeutic targets. *Naturewissenschaften* 88: 261-67.

- Frenkel D, Solomon B & Benhar I (2000) Modulation of Alzheimer's beta-amyloid neurotoxicity by site-directed single-chain antibody. *J. Neuroimmunol.* 106: 23-31.
- Gaskin F, Finley J, Fang Q, Xu S & Man S (1993) Human antibodies reactive with β -amyloid protein in Alzheimers disease. *J. Exp. Med.* 177: 1181-1186.
- Hardy J & Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-358.
- Hock C, Konietzko W, Schtreffer J, Tracy J, Garcia E, Wollmer A, Hoffman M, Maddalena A & Papassotiropoulos A (2003) Antibodies against β -amyloid slow cognitive decline in Alzheimers disease. *Neuron* 38: 547-554.
- Hoogenboom H & Chames P (2000) Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol. today* 21: 371-378
- Irizarry M & Hyman B (2001) Alzheimer disease therapeutics. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 60: 923-928.
- Jackson T, Yang D & Plaskos N, (2000) Structural studies of soluble oligómers of the Alzheimer β -amyloid peptide. *J. Mol. Biol.* 297: 73-87.
- Kayed R, Head E, Thompson J & Glabe C (2003) Common structure of soluble amyloid oligómers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300: 486-489.
- Klein W, Kraft G & Finch C (2001) Targeting small Ab oligómeros: the solution to an Alzheimers disease condundrum? *Trends Neurosci.* 24: 219-224.
- Larson EB, Shadlen MF, Wang L, McCormick WC, Bowen JD, Teri L & Kukull WA (2004) Survival after initial diagnosis of Alzheimer disease. *Ann. Intern. Med.* 140: 501-509.
- Lee VM (2001) Abeta immunization: moving a beta-peptide from brain to blood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 8931-8932.
- Lombardo JA, Stern EA, Stephen KT, Hickey GA, Bacsikai BJ & Hyman BT (2003) Amyloid- β -antibody treatment leads to rapid normalization of plaque-induced neuritic alteration *J. Neurosci.* 23: 10879-10883.
- Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z & Mautino J (2000) Amyloid β interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimers disease. *Nat. Neurosci.* 5: 460-464.
- Maimone D, Dominici R & Grimaldi L (2001) Pharmacogenomics of neurodegenerative diseases. *Eur. J. of Pharmaco.* 413: 11-29.
- Manoutcharian K, Acero G, Munguia ME, Becerril B, Massieu L, Govezensky T, Ortiz E, Marks JD, Cao C, Ugen K & Gevorkian G (2004) Human single chain Fv antibodies and a complementarity determining region-derived peptide binding to amyloid-beta 1-42. *Neurobiol. Dis.* 17: 114-121.
- Manoutcharian K, Acero G, Munguia ME, Montero JA, Govezensky T, Cao C, Ugen K & Gevorkian G (2003) Amyloid-beta peptide-specific single chain Fv antibodies isolated from an immune phage display library. *J. Neuroimmunol.* 145: 12-17.
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G & Chiswell DJ. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348: 552-554.
- Messing J (1991) Cloning in M13 phage or how to use biology at its best. *Gene*, 100: 3-12.
- Morgan D, Diamond D, Gottschall P, Ugen K, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, Di carlo G, Gordon M & Arendash G (2000) Ab peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimers disease *Nature*, 408: 982-985.
- Nussbaum R & Ellis C (2003) Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N. Eng. J. Med.* 348: 1356-1364.
- Pfeifer M, Boncristiano S, Bondolfi L, Stalde A, Deller T, Staufenbiel M, Mathews P & Jucker M (2002) Cerebral hemorrhage after passive anti-Ab immunotherapy. *Science*, 298: 1379.

- Schenk D, Barbour R, Duna W, Gordon G, Grajeda H, Mutter L & Shopp G (1999) Immunization with amyloid β attenuates Alzheimer disease like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 400: 173-177.
- Solomon B, Koppel R, Frankel D & Hanan-Aharon E (1997) Disaggregation of Alzheimer β -amyloid by site-directed mAb. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 4: 4109-4112.
- Shastri B (2003) Neurodegenerative disorders of protein aggregation. *Neurochem. Int.* 43: 1-7.
- Tanzi R & Bertram L (2001) New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron*, 32: 181-184.
- Urbanc B, Cruz L, Le R, Sanders J, Stanley E & Irizarry M (2002) Neurotoxic effects of thioflavin S-positive amyloid b deposits in transgenic mice and Alzheimers disease. *PNAS* 99: 13990-13995.
- Vickers J, Dickson T, Adlard P, Saunders H, King C & McCormack G (2000) The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 60: 139-165.
- Washington E (2002) Nerve inflammation halts trial for Alzheimers drug. *Nature*, 415: 462.
- Whitlow, M & Filpula D (1991) Single-chain Fv proteins and their fusion proteins. *Meth. Enzymol.* 2: 97-105.
- Winblad B & Blum K (2003) Hints of a therapeutic vaccine for Alzheimer's? *Neuron* 38: 517-519
- Wolfe M (2002) Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1: 859-866

Producción biológica de hidrógeno por vía fermentativa: Fundamentos y perspectivas

Gustavo Dávila-Vázquez* y Elías Razo-Flores

División de Ciencias Ambientales. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). San Luis Potosí, SLP, México. E-mail: gdv@ipicyt.edu.mx

Palabras clave: digestión anaerobia, fermentación, biohidrógeno

RESUMEN

El hidrógeno es un gas considerado como el energético del futuro debido a que su combustión o su utilización en celdas de combustible genera sólo agua como residuo. Las fermentaciones heterotróficas para la producción biológica de H₂ (Bio-H₂) son llevadas a cabo por una diversidad de microorganismos tales como anaerobios estrictos y facultativos, además de aerobios cultivados en condiciones anóxicas. Para ello se han utilizado sustratos simples como azúcares, almidón, celulosa e incluso residuos orgánicos de diversas fuentes. Esta breve revisión explora los trabajos recientes en la producción de hidrógeno por vía fermentativa, además de las limitaciones y retos dentro de esta área del conocimiento.

Key words: anaerobic digestion, dark fermentation, biohydrogen

ABSTRACT

Hydrogen is a valuable gas that is seen as a future energy carrier since its utilization via combustion or fuel cells produce pure water. Heterotrophic fermentations for biohydrogen (Bio-H₂) production are driven by a wide variety of microorganisms such as strict anaerobes, facultative anaerobes and aerobes kept under anoxic conditions. Substrates such as simple sugars, starch, cellulose, as well as diverse organic waste materials can be used for biohydrogen production. This mini-review explores the recent

research work carried out in fermentative hydrogen production. Their limitations and challenges yet to be solved are also mentioned.

INTRODUCCIÓN

Los requerimientos energéticos de la sociedad actual son casi totalmente satisfechos por las fuentes de combustibles fósiles, tales como el petróleo, carbón y gas natural. Sin embargo, existe una creciente evidencia científica de que el uso intensivo de estos recursos ha sido causa del cambio climático global y sus desastrosos efectos (Fig. 1, IPCC, 2007).



Fig. 1. Existe la necesidad de usar energías libres de emisiones de efecto invernadero.

Aunque existen algunas opciones energéticas sustentables que pueden emerger, una alternativa que cumple con las características de ser limpia y sustentable, es la utilización de hidrógeno (H₂) como combustible. El H₂ posee un alto rendimiento energético, 2.75 veces mayor que el de los hidrocarburos, y puede ser utilizado directamente para producir electricidad mediante celdas de combustible (Fig. 2). Esta tecnología presenta las ventajas de ser

muy eficiente, factible a cualquier escala y que solo produce agua y calor como desechos (Claassen *et al.*, 1999). Con ello, en la generación de energía, se reducen a cero las emisiones contaminantes que acompañan la combustión de hidrocarburos (Reith *et al.*, 2003).

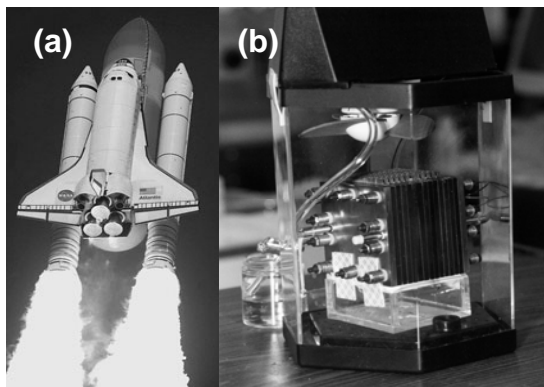


Fig. 2. (a) El H_2 posee casi 3 veces más energía (en peso) que cualquier otro combustible. (b) Además puede utilizarse para producir electricidad en celdas de combustible, con cero emisiones contaminantes.

Actualmente, alrededor de la mitad del H_2 que se produce en el mundo se obtiene de procesos termocatalíticos y de gasificación, los cuales utilizan gas natural como materia prima. Otras fuentes importantes de H_2 requieren aceites pesados y naftas, a estas les siguen la utilización de carbón natural y solo el 4% de H_2 es generado a partir de la electrolisis del agua (Logan, 2004). Sin embargo, algunos de estos procesos requieren de un alto gasto energético y dependen de recursos no renovables. Además, las reservas mundiales de hidrocarburos se han reducido a velocidad alarmante. Dadas tales perspectivas, la producción biológica de hidrógeno (*biohidrógeno: Bio- H_2*) resulta ser una alternativa como recurso energético sustentable para el futuro (Nath & Das, 2004).

ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LA PRODUCCIÓN DE $BIO-H_2$

Los sistemas biológicos producen H_2 de diversas maneras, entre las cuales están la biofotólisis directa, biofotólisis indirecta, foto-fermentaciones y fermentaciones. Cuando compuestos orgánicos son la única fuente de carbono y energía, el proceso se denomina fermentación. En el caso que se requiera de luz como fuente adicional de energía, el proceso se cataloga como fotobiológico (Reith *et al.*, 2003). Estos procesos se llevan a cabo a presión y temperatura ambiente, y por tanto requieren de menor consumo energético que los procesos químicos o electroquímicos. Las fermentaciones para la producción de H_2 pueden ser llevadas a cabo por una variedad de microorganismos, tanto en cultivos puros como mixtos (Tabla 1). Estas fermentaciones permiten la producción de $Bio-H_2$ mediante procesos relativamente sencillos, a partir de un amplio rango de sustratos potencialmente utilizables. Entre ellos destacan los desechos orgánicos de diversas fuentes (Claassen *et al.*, 1999; Kapdan & Kargi, 2006).

Desde hace algunas décadas se ha estudiado la producción de biogas (una mezcla de metano y dióxido de carbono) mediante procesos de digestión anaerobia para el tratamiento de aguas residuales con alta carga orgánica. Actualmente la digestión anaerobia tiene una aplicación práctica, en aumento, incluso a nivel industrial. También en México se han venido usando estos procesos, como una alternativa interesante en el tratamiento de aguas, con las ventajas de que son procesos que generan menos biomasa y presentan una ganancia neta de energía recuperable en forma de biogas (Noyola, 1999). La digestión anaerobia de materia orgánica compleja hasta metano y dióxido de carbono requiere de cuatro pasos principales (Fig. 3) y de la acción de un consorcio microbiano con cinco grupos de

Tabla 1. Velocidades de producción y rendimientos de producción de H₂ a partir de diversos inoculos y sustratos en cultivo en lote. No es una lista exhaustiva.

Inoculo	Sustrato ^a	VVPH (mmol H ₂ / L _{cultivo} -h) ^e	Rendimiento de H ₂	Condiciones de cultivo ^a [pH, temperatura (°C), % H ₂ en biogas (%v/v)]	Referencias
<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Sacarosa (20 g DQO/L)	8.2	2.78 mol H ₂ / mol sacarosa	5.5-6.0 ^c , 37, 64	Chen <i>et al.</i> , 2005
<i>Clostridium Saccharoperbuty- tyla cetonicum</i> ATCC 27021	Suero de leche crudo (ca. 41.4 g lactosa/L)	9.4	2.7 mol H ₂ / mol lactosa	6.0 ^d , 30, NR ^b	Ferchichi <i>et al.</i> , 2005
<i>Escherichia coli</i> W3110, SR11*, SR12*, SR13*	Ácido fórmico (25 mM)	11795	1.0 mol H ₂ / mol formiato	6.5 ^d , 37, NR	Yoshida <i>et al.</i> , 2005
Bacteria mesofílica HN001	Almidón (20 g/L)	59	2.0 mol H ₂ / mol glucosa	6.0 ^c , 37, NR	Yasuda & Tanisho, 2001
Suelo agrícola (tratamiento térmico)	Materia orgánica de aguas residuales.	6.2	100 ml H ₂ / g DQO _{removida}	6.1 ^d , 23, 60	Van Ginkel <i>et al.</i> , 2005
Lodo anaerobio (Tratamiento ácido, aclimatado en CSTR)	Sacarosa (20 g DQO/L)	96	1.74 mol H ₂ / mol sacarosa	6.1 ^d , 40, 45	Wu <i>et al.</i> , 2005
Lodo anaerobio	Glucosa (~21.3 g/L)	4.9-8.6	0.8-1.0 mol H ₂ /mol hexosa	5.7 ^c , 34.5, 59-66	Cheong & Hansen, 2001
Lodo anaerobio	Sacarosa (10 g/L)	8	1.9 mol H ₂ / mol sacarosa	5.5 ^c , 35, NR	Mu <i>et al.</i> , 2006a
Lodo anaerobio	Sacarosa (24.8 g/L)	20	3.4 mol H ₂ / mol sacarosa	5.5 ^c , 34.8, 64	Mu <i>et al.</i> , 2006b
Lodo anaerobio	Glucosa (3.76 g/L)	9	1.0 mol H ₂ / mol glucosa	6.2 ^d , 30, 66	Salerno <i>et al.</i> , 2006

Notas: ^aEn los casos en que se hayan ensayado diversas condiciones, se reportan las óptimas. ^bNR: No reportado. ^cValor controlado. ^dValor inicial, sin control. ^e En algunos casos se realizaron conversiones de unidades, en las condiciones reportadas por los autores. VVPH: Velocidad volumétrica de producción de H₂. DQO: Demanda química de oxígeno. CSTR: Reactor de tanque agitado en continuo (por sus siglas en inglés: Continuous Stirred Tank Reactor). *Cepa modificada genéticamente.

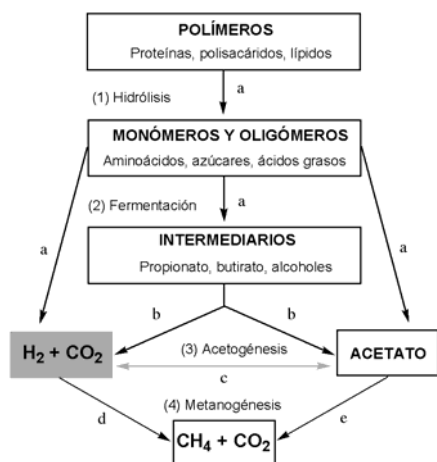


Fig. 3. Diagrama esquemático del proceso de digestión anaerobia. Diferentes grupos tróficos: (a) bacterias fermentativas, (b) bacterias acetogénicas, (c) bacterias homoacetogénicas, (d) arqueas metanogénicas

hidrogenotróficas, (e) arqueas metanogénicas acetoclásticas (Modificado de Angenent *et al.*, 2004).

microorganismos fisiológicamente distintos. En los sistemas anaerobios de tratamiento de aguas y bajo ciertas condiciones hidráulicas, este consorcio se agrega en lo que se conoce como lodos granulares (Fig. 4). Esta agregación en partículas densas ofrece ventajas operativas a estos sistemas de tratamiento. Como se muestra en la Fig. 3, los polímeros orgánicos son hidrolizados (1) hasta monómeros gracias a la acción de bacterias fermentativas. Estas mismas bacterias fermentan (2) los monómeros dando como productos una mezcla de ácidos orgánicos de bajo peso molecular y alcoholes. Estos productos son oxidados hasta ácido acético, por la acción de

bacterias acetogénicas que a la par producen H_2 , en un proceso denominado acetogénesis o acidogénesis (3).



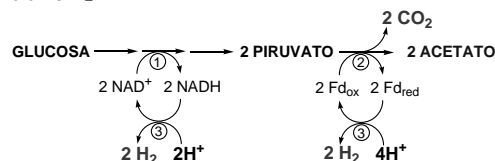
Fig. 4. Agregación del consorcio microbiano en granos que pueden llegar a medir un par de milímetros de diámetro. Con las flechas se muestran puntos de ventilación, por los que escapa el biogas producido (Tomado de: www.uasb.org/discover/granules.htm).

Este paso también incluye la producción de acetato a partir de H_2 y CO_2 . Las bacterias acetogénicas productoras de H_2 crecen en asociación sintrófica con los organismos metanogénicos hidrogenotróficos. Éstos últimos mantienen la presión parcial de H_2 (mediante su consumo) lo suficientemente baja, de tal manera que se favorezca termodinámicamente la acetogénesis. Finalmente los metanógenos acetoclásticos transforman el acetato en metano y dióxido de carbono (4). Como se puede notar en la Fig. 3, en este proceso se produce H_2 como intermediario, en un paso crucial de la digestión anaerobia. Sin embargo, cuando es de interés obtener hidrógeno como producto final, es necesario desacoplar su producción (acidogénesis) del consumo (metanogénesis). Para lograrlo, partiendo del mismo consorcio metanogénico, es necesario hacer una selección de la población microbiana para eliminar a los consumidores de H_2 . Afortunadamente, algunas especies de *Bacillus* o *Clostridium* productoras de H_2 , son resistentes a temperaturas elevadas o a la desecación gracias a la formación de esporas (Setlow, 2000). Por lo tanto, tratando térmicamente (más de $90^\circ C$, por un mínimo de 20 min) el consorcio inicial, se obtienen esporas de organismos productores de Bio- H_2 y se eliminan a los metanogénicos que no son

capaces de esporular (Cheong & Hansen, 2006b). Otra estrategia, para obtener predominantemente una población productora de Bio- H_2 , a partir de un consorcio metanogénico, consiste en cultivar el consorcio en continuo a temperaturas mesofílicas, usando generalmente sustratos simples (glucosa, sacarosa), a un pH de entre 4 – 7 y tiempos de retención hidráulico (TRH) cortos (5-10 h) (Hawkes *et al.*, 2007).

En la mayoría de sistemas biológicos fermentativos, todo el Bio- H_2 producido puede ser atribuido a los electrones derivados de una reacción: la descarboxilación oxidativa del piruvato mediante la piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (Fig. 5). Las hexosas pueden ser metabolizadas hasta piruvato mediante varias rutas, a menudo mediante la glucólisis o la ruta Entner-Doudoroff. Ambas producen dos mol de piruvato y dos mol de NADH, por cada mol de hexosa transformado.

(a) $PpH_2 < 60$ Pa:



(b) $PpH_2 > 60$ Pa:

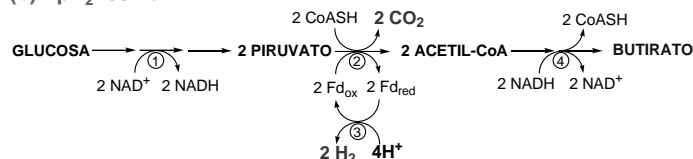


Fig. 5. Efecto de la presión parcial de hidrógeno (PpH_2) sobre la producción biológica de hidrógeno. (a) La oxidación de NADH mediante la producción de H_2 es termodinámicamente favorable solo cuando la PpH_2 es menor a 60 Pa ($\sim 10^{-4}$ atm), de lo contrario; (b) se forman otros productos de reacción. Reacciones: (1) metabolismo de la glucosa hacia piruvato; (2) descarboxilación del piruvato; (3) reducción de protones a H_2 ; (4) fermentación butírica. (Modificado de Angenent *et al.*, 2004)

Por tanto, el metabolismo de las hexosas en bacterias que poseen la piruvato-ferredoxina oxidoreductasa puede resultar en la formación de 2 mol de hidrógeno por mol de hexosa. Si la presión parcial de hidrógeno (PpH_2) es suficientemente baja ($< 60 Pa$), el NADH producido también puede utilizarse

para generar H₂ (en el mejor de los casos, 2 mol de H₂ adicionales por mol de hexosa). Pero probablemente la mayoría del NADH sea oxidado mediante otras rutas, tales como la fermentación butírica (Fig. 5, reacción 4), la fermentación láctica o la producción de etanol, butanol o acetona (Jones & Woods, 1986). La aparición de estos productos es el resultado de la operación de rutas alternas para el metabolismo del piruvato que compiten con la piruvato ferredoxina oxidoreductasa. Esto se asocia a sistemas que producen menos de dos mol de H₂ por mol de hexosa (Angenent *et al.*, 2004).

En el caso de que el acetato sea el producto final de la fermentación, se obtiene un rendimiento teórico máximo de 4 mol de H₂ por mol de glucosa. Cuando se obtiene butirato como producto final, se encuentra un máximo teórico de 2 mol de H₂ por mol de glucosa (Nandi & Sengupta, 1998). Los productos metabólicos más reducidos como el etanol, butanol y lactato, contienen átomos de hidrógeno que no fue liberado como gas. Por lo que, para maximizar el rendimiento de H₂, el metabolismo microbiano debe de ser alejado de la producción tanto de alcoholes (etanol, butanol) como de ácidos reducidos (lactato), y dirigirse hacia la biosíntesis de ácidos grasos volátiles (AGVs: acetato, propionato) (Hawkes *et al.*, 2002; Levin *et al.*, 2004).

Estos bajos rendimientos son la consecuencia natural de que tales fermentaciones han sido optimizadas por la evolución hacia la producción de biomasa y no de hidrógeno (Hallenbeck & Benemann, 2002). Aunque estos rendimientos aún se encuentren lejos de los estequiométricos (12 mol H₂/mol hexosa), las fermentaciones productoras de hidrógeno se consideran procesos promisorios a gran escala, todavía en ciernes.

ASPECTOS BIOTECNOLÓGICOS DE LA PRODUCCIÓN DE BIO-H₂

Se ha reportado que la producción de Bio-H₂ en las bacterias fermentativas es altamente dependiente de las condiciones de fermentación tales como la naturaleza química y la concentración de sustrato, tipo

de inóculo y tratamiento del mismo, el pH, TRH, tiempo de retención de sólidos (TRS) y la presión parcial de hidrógeno, lo cual afecta el balance metabólico. Por tanto, la eficiencia en la producción de H₂ y los productos finales de fermentación bacteriana dependen de las condiciones ambientales del cultivo. Como consecuencia de lo anterior, todavía no se sabe hasta que punto puede incrementarse la producción de Bio-H₂, mediante la manipulación de las condiciones de cultivo y la ingeniería de flujos metabólicos (Hallenbeck & Benemann, 2002; Hallenbeck, 2005). Actualmente en este campo del conocimiento, se estudian el desempeño en diversos ambientes y bajo diversos sistemas de cultivo, de sustratos e inóculos de diversos orígenes (Tablas 1 y 2).

En las Tablas 1 (cultivos en lote) y 2 (cultivos en continuo) se muestran algunos trabajos recientes de producción de Bio-H₂ por vía fermentativa. Como puede observarse, en ningún caso los rendimientos reportados rebasan la barrera biológica de 4 mol de H₂ por mol de monosacárido u 8 mol de H₂ por mol de disacárido (para una fermentación en una sola etapa). Además del rendimiento, es muy importante conocer la velocidad volumétrica de producción de H₂ (VVPH). Siguiendo la propuesta hecha por algunos autores (Levin *et al.*, 2004; Loubette & Junker, 2006) hemos tratado de estandarizar los resultados reportados de VVPH, esto con la finalidad de facilitar la comparación entre los mismos.

Como se ha mencionado, uno de los usos energéticos (el más promisorio) del Bio-H₂ es su utilización en celdas de combustible (CC) para producir electricidad. Por tanto, es necesario saber si los sistemas de fermentación reportados son capaces de suministrar el H₂ requerido para operar continuamente una CC. Este estudio fue hecho por Levin *et al.* (2004) y concluyen que debido a que los valores más altos de VVPH (21-121 mmol H₂/L-h) están reportados para procesos mesofílicos fermentativos, estos requieren de reactores más pequeños para suministrar H₂ a una CC. Por ejemplo, para alimentar una CC de 25 kW (que produciría alrededor de 22,000 kWh/año) se requerirían

biorreactores de entre 500 - 2,850 litros. Tal producción de electricidad sería suficiente para satisfacer la demanda promedio de una residencia que utilice calefacción eléctrica.

PERSPECTIVAS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE Bio-H₂

A la fecha la mayoría de lo publicado en esta área del conocimiento lo constituyen esfuerzos a nivel laboratorio, y todavía existen pocos trabajos a nivel sustratos más apropiados y microorganismos hidrogenogénicos más eficientes, además de mejorar planta piloto (Loubette & Junker, 2006). Dentro de los retos a abordar se encuentran: el aumentar los rendimientos de producción (H₂/sustrato), encontrar los procesos de recuperación de H₂ de los biorreactores. Algunos de estos problemas ya se están abordando, y se han propuesto sistemas de producción en dos etapas (acidogénesis-metanogénesis, o acidogénesis-fotofermentaciones) para aumentar los rendimientos de producción de H₂.

Además de procesos más sofisticados en los cuales se acopla la acidogénesis a reactores bioelectroquímicamente asistidos, logrando con esto rendimientos de hasta 8-9 mol de H₂/mol de glucosa (Liu *et al.*, 2005). También existen reportes recientes en los que se logró purificar el gas producido (típicamente una mezcla 40-60% H₂ y CO₂, respectivamente) mediante tecnología de membranas, logrando remover el CO₂. Este paso es crucial para la aplicación práctica del Bio-H₂ en las celdas de combustible. Aquí vale la pena mencionar que el CO₂ generado en la producción de Bio-H₂ proviene de biomasa (azúcares, o materia orgánica), por lo que pertenece al ciclo natural del carbono en la biosfera.

Finalmente, algo que queda claro es que para resolver todos estos retos es necesario el trabajo multidisciplinario y de equipo entre científicos y técnicos de diversas áreas.

Tabla 2. Velocidades de producción y rendimientos de producción de H₂ a a partir de diversos inoculos y sustratos en cultivo en continuo. No es una lista exhaustiva

Inoculo	Sustrato	VVPH (mmol H ₂ / L _{cultivo} -h) ^c	Rendimiento de H ₂	Condiciones de cultivo [TRH (h), Carga orgánica, pH, Temperatura (°C), H ₂ en biogas (% v/v)]	Referencias
Cultivo mixto	Sacarosa (20 g DQO/L)	17	3.5 mol H ₂ /mol sacarosa	12, NR, 6.8, 35, 45.9	Lin <i>et al.</i> , 2006
Cultivo mixto	Sacarosa (40 g/L)	20	1.15 mol H ₂ /mol hexosa	12, 80 g/L-d, 5.2, 35, 60	Kyazze <i>et al.</i> , 2006
Cultivo mixto inmovilizado en gel de silicona	Sacarosa (30 g DQO/L)	612.5	3.86 mol H ₂ /mol sacarosa	0.5, NR, 6.5, 40, 44	Wu <i>et al.</i> , 2006
Cultivo mixto	Xilosa (20 g DQO/L)	5	1.1 mol H ₂ /mol xilosa	12, NR, 7.1, 35, 32	Lin & Cheng, 2006
Cultivo mixto	Glucosa (15 g DQO/L)	13.23	1.93 mol H ₂ /mol glucosa	4.5, 80 g DQO/L-d, 5.5, 37, 67	Zhang <i>et al.</i> , 2004
Lodo deshidratado	Glucosa (4 g DQO/L)	3.47	1.9 molH ₂ /mol glucosa	10, NR, 5.5, 35, 67	Salerno <i>et al.</i> , 2006
Cultivo mixto	Sacarosa (20 g DQO/L)	15.6	3.6 mol H ₂ /mol sacarosa	12, NR, 5.5, 35, 50	Lin & Chen, 2006
Lodo anaerobio	Sacarosa (20 g DQO/l)	52.6	3.43 molH ₂ /mol sacarosa	12, NR, 6.8, 35, 50.9	Lin & Lay, 2005
Cultivo mixto	Sacarosa y azúcar de remolacha	5.15	1.9 molH ₂ /mol hexosa	15, 16 Kg azúcar/m ³ -d, 5.2, 32, NR	Hussy <i>et al.</i> , 2005
<i>C. thermolacticum</i> DSM 2910	Lactosa (10 g/L)	2.58	2.1-3 mol H ₂ /mol lactosa	17.2, NR, 7.0, 58, 55	Collet <i>et al.</i> , 2004

Notas: ^aEn los casos en que se hayan ensayado diversas condiciones, se reportan las óptimas. ^bNR: No reportado. ^cEn algunos casos se realizaron conversiones de unidades, en las condiciones reportadas por los autores. DQO: Demanda química de oxígeno. VVPH: Velocidad volumétrica de producción de H₂. CSTR: Reactor de tanque agitado en continuo.

INVESTIGACIÓN EN MÉXICO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIO-H₂

Actualmente en el país, existen algunos grupos dedicados al estudio de la producción biológica de H₂ por vía fermentativa. Destaca el caso del grupo del Dr. Héctor M. Poggi-Varaldo del CINVESTAV con algunos trabajos publicados (Valdez-Vazquez *et al.*, 2005a; Valdez-Vazquez *et al.*, 2005b; Valdez-Vazquez *et al.*, 2006a; Valdez-Vazquez *et al.*, 2006b), y otros que inician en esta línea y/o que están en vías de consolidación. Tal es el caso de nuestro grupo en el IPICYT, el grupo de investigación del Dr. Germán Buitrón Méndez del II-UNAM, y en el CICY el grupo coordinado por la Dra. Mascha Smit.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Sonia Arriaga, por su valiosa participación en la elaboración de este trabajo.

REFERENCIAS

Angenent LT, Karim K, Al-Dahhan MH, Wrenn BA & Domiguez-Espinosa R (2004) Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.* 22:477-485.

Chen WM, Tseng ZJ, Lee KS & Chang JS (2005) Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *Int. J. Hydrogen Energy.* 30:1063-1070.

Cheong DY & Hansen CL (2006a) Acidogenesis characteristics of natural, mixed anaerobes converting carbohydrate-rich synthetic wastewater to hydrogen. *Process Biochem.* 41:1736-1745.

Cheong DY & Hansen CL (2006b) Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:635-643.

Claassen PAM, van Lier JB, Lopez Contreras AM, van Niel EWJ, Sijtsma L, Stams AJM, de Vries SS & Weusthuis RA (1999) Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:741-755.

Collet C, Adler N, Schwitzguebel JP & Peringer P (2004) Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *Int. J. Hydrogen Energy.* 29:1479-1485.

Ferchichi M, Crabbe E, Gil GH, Hintz W & Almadidy A (2005) Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *J. Biotechnol.* 120:402-409.

Hallenbeck PC (2005) Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci. Technol.* 52:21-29.

Hallenbeck PC & Benemann JR (2002) Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int. J. Hydrogen Energy.* 27:1185-1193.

Hawkes FR, Dinsdale R, Hawkes DL & Hussy I (2002) Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *Int. J. Hydrogen Energy.* 27:1339-1347.

Hawkes FR, Hussy I, Kyazze G, Dinsdale R & Hawkes DL (2007) Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *Int. J. Hydrogen Energy.* 32:172-184.

Hussy I, Hawkes FR, Dinsdale R & Hawkes DL (2005) Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. *Int. J. Hydrogen Energy.* 30:471-483.

IPCC (2007) Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Intergovernmental Panel on Climate Change. <http://www.ipcc.ch/>

Jones DT & Woods DR (1986) Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* 50:484-524.

Kapdan IK & Kargi F (2006) Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microbiol. Technol.* 38:569-582.

Kyazze G, Martinez-Perez N, Dinsdale R, Premier GC, Hawkes FR, Guwy AJ & Hawkes DL (2006) Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production. *Biotechnol. Bioeng.* 93:971-979.

Levin DB, Pitt L & Love M (2004) Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int. J. Hydrogen Energy.* 29:173-185.

- Lin CY & Chen HP (2006) Sulfate effect on fermentative hydrogen production using anaerobic mixed microflora. *Int. J. Hydrogen Energy*. 31:953-960.
- Lin CY & Cheng CH (2006) Fermentative hydrogen production from xylose using anaerobic mixed microflora. *Int. J. Hydrogen Energy*. 31:832-840.
- Lin CY & Lay CH (2005) A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *Int. J. Hydrogen Energy*. 30:285-292.
- Lin CY, Lee CY, Tseng IC & Shiao IZ (2006) Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora. *Process Biochem*. 41:915-919.
- Liu H, Grot S & Logan BE (2005) Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate. *Environ. Sci. Technol*. 39:4317-4320.
- Logan BE (2004) Extracting hydrogen and electricity from renewable resources. *Environ. Sci. Technol*. 38:160A-167A.
- Loubette N & Junker M (2006). State of the art of biological hydrogen production processes. *16th World Hydrogen Energy Conference*, Lyon, Francia, p. 220.
- Mu Y, Wang G & Yu HQ (2006a) Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. *Bioresour. Technol*. 97:1302-1307.
- Mu Y, Wang G & Yu HQ (2006b) Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. *Enzyme Microbial Technol*. 38:905-913.
- Nandi R & Sengupta S (1998) Microbial production of hydrogen: an overview. *Crit. Rev. Microbiol*. 24:61-84.
- Nath K & Das D (2004) Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 65:520-529.
- Noyola A (1999) Desarrollo de tecnologías mexicanas en tratamiento de aguas residuales: una experiencia. *Interciencia*. 24:169-172.
- Reith JH, Wijffels RH & Barten H (2003) Bio-methane & Bio-hydrogen: Status and perspectives of biological methane and hydrogen production. Dutch Biological Hydrogen Foundation, La Haya, Holanda.
- Salerno MB, Park W, Zuo Y & Logan BE (2006) Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water Res*. 40:1167-1172.
- Setlow P (2000) Resistance of bacterial spores. *In: Bacterial stress responses*. Storz G & Hengge-Aronis R (eds). ASM Press, pp 217-230.
- Valdez-Vazquez I, Rios-Leal E, Carmona-Martinez A, Munoz-Paez KM & Poggi-Varaldo HM (2006a) Improvement of biohydrogen production from solid wastes by intermittent venting and gas flushing of batch reactors headspace. *Environ. Sci. Technol*. 40:3409-3415.
- Valdez-Vazquez I, Rios-Leal E, Esparza-Garcia F, Cecchi F & Poggi-Varaldo HA (2005a) Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *Int. J. Hydrogen Energy*. 30:1383-1391.
- Valdez-Vazquez I, Rios-Leal E, Munoz-Paez KM, Carmona-Martinez A & Poggi-Varaldo HM (2006b) Effect of inhibition treatment, type of inocula, and incubation temperature on batch H₂ production from organic solid waste. *Biotechnol. Bioeng*. 95:342-349.
- Valdez-Vazquez I, Sparling R, Risbey D, Rinderknecht-Seijas N & Poggi-Varaldo HM (2005b) Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes. *Bioresour. Technol*. 96:1907-1913.
- Van Ginkel SW, Oh SE & Logan BE (2005) Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. *Int. J. Hydrogen Energy*. 30:1535-1542.
- Wu SY, Hung CH, Lin CN, Chen HW, Lee AS & Chang JS (2006) Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-

immobilized and self-flocculated sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 93:934-946.

Wu SY, Lin CN, Chang JS & Chang JS (2005) Biohydrogen production with anaerobic sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer.

Int. J. Hydrogen Energy. 30:1375-1381.

Yasuda K & Tanisho S (2006). Fermentative hydrogen production from artificial food wastes. *16th World Hydrogen Energy Conference*, Lyon, Francia, p. 210.

Yoshida A, Nishimura T, Kawaguchi H, Inui M & Yukawa H (2005) Enhanced hydrogen production from formic acid by formate hydrogen lyase-overexpressing *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6762-6768.

Zhang JJ, Li XY, Oh SE & Logan BE (2004) Physical and hydrodynamic properties of flocs produced during biological hydrogen production. *Biotechnol. Bioeng.* 88:854-860.

Los Cultivos Mixtos y las Fermentaciones Alcohólicas

Pilar Escalante-Minakata¹ y Vrani Ibarra-Junquera^{2*}

¹*División de Biología Molecular, IPICYT; E-mail: minakata@ipicyt.edu.mx*

²*Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Colima, E-mail: vij@ucol.mx*

Palabras clave: Fermentaciones alcohólicas, vinos, aroma, cultivos mixtos, cultivos secuenciales, dinámica poblacional.

RESUMEN

La dinámica poblacional de cultivos mixtos y secuenciales en fermentaciones de mostos de frutas es un problema muy interesante desde el punto de vista teórico y tecnológico. Por cultivos mixtos nos referimos a que se encuentran presentes desde un inicio más de una especie/raza de microbio y por cultivo secuencial a que serán añadidas a lo largo de la fermentación. Dichos procesos tienen un papel fundamental en la industria de bebidas fermentadas, de ahí la importancia de su estudio y modelado. Los modelos de estos procesos deben representar la dinámica de múltiples especies de microorganismos que crecen en una mezcla de sustratos, porque el mosto de frutas está formado por una proporción importante de hexosas y pentosas. En las bebidas y en general en los alimentos fermentados un aspecto muy importante son las propiedades organolépticas, por ello resulta fundamental estudiar la dinámica poblacional y el impacto de estos consorcios microbianos en el perfil de compuestos volátiles, y su influencia en el perfil sensorial. El objetivo de este trabajo es mostrar un panorama general de estos ecosistemas fermentativos desde el punto de vista biológico, matemático y tecnológico.

Keywords: Alcoholic fermentations, wine, aroma, mixed-cultures, sequential-cultures, population dynamics.

ABSTRACT

The population dynamics of mixed-culture and sequential-cultures in fruit-must fermentation is a

very interesting problem from both the theoretical and technological stand point. By mixed-culture we refer to those fermentations in which more than one strain/species are present from the beginning of the process; and by sequential to those in which different microorganisms are added along the process. These kinds of fermentations play a key role in industry of fermented beverages. The mathematical models of such processes should represent the dynamics of multiple species growing in a mixture of substrates as the fruit must composition includes an important proportion of hexoses and pentoses. Since the flavor is a basic aspect of beverages, and in general of all fermented foods, it is fundamental to study the population dynamics and its impact in the organoleptic properties, through the influence in the volatile compound profile. The goal of this paper is to present a panorama of the investigations of these fermentative ecosystems from a biological, mathematical, and technological stand point.

INTRODUCCIÓN

Durante décadas la investigación en biotecnología se enfocó en cultivos puros, ahora los efectos sinérgicos en cultivos mixtos de microorganismos están siendo objeto de un creciente interés (Schink, 2002). La dinámica del cultivo mixto de microorganismos en mezclas de sustratos es un problema muy interesante desde el punto de vista teórico y tecnológico. Hoy en día se reconoce que para entender la presencia, el crecimiento y el papel que juegan los microorganismos en los bioprocesos se necesita un enfoque de ecología microbiana (Días &

Wacher, 2003). Los cultivos mixtos que crecen en mezclas de sustratos juegan un papel fundamental en la bioingeniería.

La *producción de bioetanol*, es un ejemplo de mucho interés. La materia prima usada en la fermentación para producirlo consiste típicamente en una mezcla de hexosas y pentosas. Por tanto el bioetanol es el producto de la transformación de una mezcla de sustratos mediante microorganismos. Cuando un microorganismo crece en presencia de al menos dos sustratos, uno de ellos es normalmente agotado primero, lo que resulta en un cambio en la pendiente de la curva de crecimiento de biomasa. La población de levaduras usadas en la producción de bioetanol, a escala industrial, puede variar de acuerdo con las condiciones particulares del proceso de cada planta así como del estrés que el ambiente fermentativo impone a los consorcios de microorganismos. Por ello, las levaduras aisladas de una industria en particular pueden estar adaptadas a dichas condiciones y por tanto son mejores para ese proceso que una cepa comercial pura (da Silva-Filho *et al.*, 2005).

Los *alimentos fermentados* constituyen igualmente un área de gran interés. Su calidad y producción en condiciones controladas dependen del conocimiento y control de la microbiota presente (Días & Wacher, 2003). Un ejemplo clásico en alimentos fermentados con cultivos mixtos es el yogurt, el cual es el producto de la interacción de *Lactobacillus bulgaris* y *Streptococcus thermophilus* (Marshall, 1987). Para obtener una idea más detallada de la organización y dinámica de las comunidades microbianas en alimentos fermentados, será necesaria la detección de su actividad y el papel que esta juega en el producto terminado.

En este trabajo revisaremos tres aspectos fundamentales de las fermentaciones alcohólicas basadas en consorcios microbianos. Primero hablaremos del punto más importante en una bebida: el sabor, ya que éste determinará la

aceptación del producto final. Después en la sección “los vinos y la dinámica poblacional” daremos un breve panorama del estado de arte de las fermentaciones alcohólicas que se llevan cabo con cultivos mixtos. Finalmente, en la sección “modelando la dinámica poblacional” presentaremos un panorama del modelado de estos complejos sistemas biológicos.

EL AROMA Y LOS VINOS

Según Abbott (1999) los atributos que más condicionan la aceptabilidad del alimento por parte del consumidor son los relacionados con la calidad sensorial u organoléptica, que incluye la apariencia, la textura, el aroma y el gusto. En este sentido, uno de los rasgos organolépticos más complejos y determinantes de la calidad sensorial es el aroma del alimento, que se puede definir como la sensación global producida por los compuestos que interaccionan con las terminaciones nerviosas sensitivas del gusto, del olfato y la visión (Goff & Klee, 2006). El aroma está compuesto por centenares de compuestos volátiles que pertenecen a distintas familias químicas y que se encuentran en muy variable concentración (Ruiz & Martínez, 1997). La elevada producción y la necesidad de encontrar alimentos aromáticamente estandarizados, requieren herramientas analíticas eficientes para la caracterización y algoritmos que permitan el control automático de la producción. Cabe mencionar que el umbral de percepción de las sustancias que condicionan el aroma puede variar desde $\mu\text{g/l}$ a mg/l , pero no necesariamente por encontrarse en mayor concentración su incidencia será mayor (Riu, 2005). En este sentido, el impacto sensorial esta relacionado con las presencia de compuestos volátiles. Así pues, una de las principales variables a medir es la fracción aromática.

En enología lo usual es clasificar los aromas del vino en función de la etapa en la que se forman. El aroma puede provenir de la fruta, es el llamado

aroma primario que incluye dos subcategorías: el *varietal* (compuestos volátiles libres presentes en la uva que dependerán de la variedad utilizada y sus características) y el *prefermentativo* (aromas que se liberan de su combinación con otras sustancias llamadas precursores, debido a la actividad enzimática provocada por la tecnología aplicada). El *aroma secundario* proviene de la levadura que se desarrolla durante la primera fermentación, está ligado a la presencia de ciertos tipos de enzimas y es el aroma mayoritario; y finalmente el *aroma terciario* o *post-fermentativo* es el que se forma durante la crianza. Este último se desarrolla mediante reacciones químicas y/o bioquímicas a partir de aromas de etapas anteriores (Riu, 2005).

El perfil aromático característico de las frutas depende de una mezcla compleja de compuestos químicos que se va formando durante la maduración del fruto, a través de distintas rutas bioquímicas a partir de precursores de las plantas (Gómez & Ledbetter, 1997; Lund & Bohlmann, 2006). El desarrollo de los aromas en las frutas tiene lugar durante el climaterio, que es el periodo crucial del proceso de maduración. Pequeñas cantidades de carbohidratos, lípidos, proteínas y aminoácidos se catabolizan y dan lugar a distintos compuestos volátiles. La velocidad de formación de estas sustancias aumenta después del inicio del climaterio y el proceso continúa tras la recolección de la fruta hasta que comienza la senescencia (Arthey & Ashurst, 1997). Al influir en la ecología del proceso de elaboración de vino, las levaduras contribuyen al sabor del vino. El metabolismo y la actividad enzimática de cada especie de microorganismo así como las combinaciones de éstas impactan en el aroma. Los característicos sabores frutales del vino se deben principalmente a la esterificación de los alcoholes superiores sintetizados por las levaduras.

LOS VINOS Y LA DINÁMICA POBLACIONAL

La producción de *vino* es otro proceso de especial interés. Cabe mencionar que el término "*vino*" se aplica al líquido resultante de la fermentación alcohólica, total o parcial, del zumo de frutas, sin adición de ninguna sustancia. Se pueden encontrar además del vino de uva, vinos de mango y plátano entre otros vinos de frutas. Desde el punto de vista biotecnológico, el vino es el producto de complejas interacciones entre levaduras y bacterias que comienza desde que el fruto está en la plantación y continúa a lo largo de todo el proceso de fermentación, hasta el momento en que el producto es embotellado. En el proceso de elaboración de vino de uva, el tipo y cantidad de aroma depende de varios factores: microorganismos fermentantes, condiciones ambientales (suelo y clima), estado de la fruta, proceso de fermentación, pH del mosto, cantidad de dióxido de azufre, aminoácidos presentes en el mosto (Lilly *et al.*, 2000). En el caso de los vinos de uva está bien estudiado que aunque el tipo de uva y las condiciones de cultivo son claves en el sabor del vino, los microorganismos (en especial las levaduras) tiene un papel muy importante en las características organolépticas (Fleet, 2003). De León-Rodríguez *et al.* (2006) reportaron que distintos tipos de mezcal joven, reposado y añejo producidos con mosto de *Agave salmiana*, presentaron diferente composición de compuestos volátiles como etanol, alcoholes superiores y ésteres, y que éstos contribuían de forma importante al perfil sensorial. De estos trabajos se puede concluir que la interacción entre la materia prima y el proceso de elaboración en la bebida son los responsables de las propiedades organolépticas de las bebidas alcohólicas provenientes de la fermentación.

Tradicionalmente la producción de vinos se ha realizado a partir de fermentaciones espontáneas de los mostos llevadas a cabo por cepas de levaduras endémicas residentes en las superficies

de las uvas y de los equipos de las bodegas. Dentro de las fermentaciones alcohólicas basadas en consorcios microbianos las fermentaciones espontáneas se pueden considerar las pioneras de la biotecnología. Estas fermentaciones espontáneas de mostos son un complejo proceso que involucra la acción de diferentes géneros y especies de levaduras e incluso bacterias. El equilibrio entre los diferentes microorganismos presentes en la flora inicial, el orden de sucesión entre especies y la diversidad de la flora pueden variar entre un año y otro. Dando así origen a la diferencia en la velocidades de fermentación y a las características del vino de año a otro (Querol *et al.*, 1992 y 1994).

Existen argumentos a favor y en contra de las fermentaciones espontáneas. El principal argumento a favor indica que en estas fermentaciones se consiguen características organolépticas típicas de la zona que no estarían presentes si se utilizara un inóculo de cepas foráneas. Sin embargo la calidad del producto puede ser muy variable. La composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota presente a lo largo de la fermentación del mosto puede depender principalmente de los siguientes factores: región de donde es originaria la fruta, procedimiento de producción, tipo de bebida a ser producida, concentración inicial de la microbiota, temperatura, pH, SO₂, y concentración de etanol (Torija *et al.*, 2001; Granchi *et al.*, 2002).

El uso de inóculos con poblaciones mixtas y/o inóculos secuenciales, constituye una herramienta importante para estandarizar el producto y preservar aquellas características deseables. Seleccionar cepas de una determinada región parece ser la solución para asegurar un producto estandarizado preservando las características organolépticas que distinguen a la zona de producción. Además del *Saccharomyces cerevisiae* se han reportado muchas otras levaduras presentes en la fermentación del vino: *Hanseniaspora guilliermondii*, *Kloeckera apiculata*

(Romano *et al.*, 1992, 1997a; Zironi *et al.*, 1993; Gil *et al.*, 1996), *Pichia anomala* (Rojas *et al.*, 2001), *Candida stellata*, *Torulaspora delbrueckii* (Ciani & Maccarelli, 1998), *Candida valida*, *Bretanomyces bruxellensis*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Deckera intermedia* (Mateo *et al.*, 1991;) y *Candida catarellii* (Toro & Vázquez, 2002). Todas estas levaduras mejoran el *bouquet* del vino, pero no son capaces de terminar la fermentación debido a su poca tolerancia a altas concentraciones de etanol (Clemente-Jiménez *et al.*, 2005). Por esta razón, varios autores ya han estudiado fermentaciones usando mezclas de levaduras, ya sea inoculadas simultáneamente (Moreno *et al.* 1991; Gil *et al.*, 1996; Erten, 2001) o de manera secuencial (Herraiz *et al.*, 1990; Zironi *et al.*, 1993; Toro & Vázquez, 2002). Cabe mencionar que estos trabajos no han sido abordados desde una perspectiva de sistemas dinámicos y no han generado modelos que permitan explorar aspectos de control y propiedades dinámicas. Los mecanismos de interacción de estos ecosistemas de la fermentación incluyen: producción de enzimas líticas, etanol, dióxido de azufre y efectos de tipo “killer”; competencia por los nutrientes, oxígeno, producción de dióxido de carbono.

MODELANDO LA DINÁMICA POBLACIONAL

Es muy importante la identificación y el entendimiento de las interacciones enológicas que ocurren en estos consorcios de levaduras y bacterias. Los trabajos pioneros de Jacob Monod y JBS Haldane han servido como un punto de inicio de importantes modelos matemáticos que dan cuenta de diferentes aspectos del crecimiento microbiano en monocultivos por lote, lote-alimentado y continuos. Estos trabajos suponen cultivos puros. Actualmente existe una vasta cantidad de artículos sobre modelos matemáticos de crecimiento microbiano (Nielsen *et al.*, 2003). Sin embargo, en el ámbito de cultivos mixtos la literatura se reduce considerablemente. Por supuesto, en general, cuando la complejidad de un

problema crece, la posibilidad de analizarlo en términos precisos disminuye.

En el modelado de la mayoría de estos sistemas biológicos se asume de manera implícita que son de naturaleza continua, aplicando las ecuaciones diferenciales como la herramienta para su modelado. Las variables analizadas son denominadas estados, y son propiedades tales como la concentración de microorganismo (biomasa en g/l), concentración del producto (g/l), y concentración de sustrato (g/l); y en algunos casos concentración interna de enzimas. Sin embargo todos estos estados son muy difíciles de medir (sino es que imposible) en tiempo real. Se necesitan desarrollar modelos basados en ecuaciones diferenciales ordinarias que contemplen entre sus estados variables que sean fácilmente monitoreables en tiempo real. Dichos modelos permitirían el desarrollo de controladores que hagan frente a las perturbaciones inherentes a estos sistemas.

Se ha descrito como es posible inferir teóricamente la presencia de cultivos mixtos a partir de datos de biomasa total, usando una transformada ondeleta (Ibarra-Junquera *et al.*, 2006a). La idea central desarrollada por Ibarra-Junquera *et al.*, (2006a) se basa en el hecho de que todo evento a nivel metabólico (cambio de sustrato) o a nivel de interacciones entre especies (crecimiento mixto con competencia o sin ella) genera la presencia de singularidades en la señal de biomasa total. Es decir, estos eventos se asocian a la presencia de puntos en donde alguna derivada no exista, relacionando así el grado de singularidad a la naturaleza del evento que la provocó. La herramienta usada para detectar la existencia de singularidades y su grado fue la transformada ondeleta, la cual es un análogo de la transformada de Fourier a nivel local. En concreto, Ibarra-Junquera *et al.*, (2006a) mostraron teóricamente como cambios en la fuente de sustrato provocan singularidades en la segunda derivada de la señal de biomasa total mientras que

crecimientos mixtos, sin competencia, inducen singularidades en la primera derivada.

Por otra parte se han realizado trabajos en el caso del mezcal donde se encontró que es posible monitorear en línea el proceso fermentativo a partir de medir el potencial redox durante la fermentación (Escalante-Minakata *et al.*, 2006b), asociando la señal de redox a la biomasa total. Ambas herramientas (el potencial redox y la transformada ondeleta) son de gran utilidad para entender la dinámica de las fermentaciones. Al estudiar la dinámica poblacional de las fermentaciones con cultivos mixtos se busca entender y eventualmente manipular (indirectamente) el mecanismo a través del cual una especie de microorganismo impacta a otra y finalmente a las propiedades organolépticas del producto de interés. Para incrementar la producción y la calidad del producto son necesarias técnicas para el monitoreo en línea y el control automático de estos complejos procesos fermentativos. Por otra parte, es importante resaltar que la mayoría de controles que operan actualmente en la industria de los bioprocesos están basados en modelos lineales del proceso, a pesar de que prácticamente todos los procesos biológicos son de naturaleza no lineal. Por ello es de esperarse que estrategias para su monitoreo y control basadas directamente en modelos no lineales muestren considerables ventajas y mejor desempeño en estos procesos fermentativos tan altamente no lineales.

Sin embargo, en la mayoría de los procesos bioquímicos es difícil desarrollar modelos matemáticos, basados en ecuaciones diferenciales ordinarias, que sean razonablemente precisos y cuyos valores estimados de parámetros sean confiables. No obstante, dichos modelos resultan fundamentales para la optimización y el desarrollo de estrategias de control del proceso. En particular en los reactores biológicos las incertidumbres en el modelo se deben a un limitado conocimiento del proceso real, a no linealidades, dinámicas no

modeladas, presencia de ruido interno o externo, influencias del ambiente y parámetros variantes en el tiempo. La presencia de tales incertidumbres es la causa del desajuste entre el modelo optimizado y el proceso real, lo cual puede degradar el desempeño del controlador provocando serios problemas de estabilidad en el proceso. Por lo tanto resulta un reto de gran importancia, diseñar esquemas de control para procesos bioquímicos, que sean robustos a incertidumbres en el modelo.

Los primeros modelos de crecimiento mixto en un sustrato único, en quimiostato, mostraron teórica y experimentalmente, que no más de una especie sobrevive, sin importar la velocidad de dilución, ni la concentración de sustrato alimentado (Aris & Humphrey, 1977; Hansen & Hubell, 1980; Powell, 1958). Sin embargo, yacía una contradicción en este resultado, la llamada "paradoja del plancton" (Hutchinson, 1961). Por ello el problema de crecimiento mixto en una mezcla de sustratos atrajo el interés de muchos matemáticos. Este interés resultó en dos artículos fundamentales, que muestran que en presencia de múltiples sustratos limitantes, es importante especificar los requerimientos nutricionales satisfechos por los nutrientes (León & Tumpson, 1975; Tilman, 1977). Es decir, dos sustratos son mutuamente *sustituibles* si ambos satisfacen exactamente los mismos requerimientos nutricionales y con ello el crecimiento continúa incluso en ausencia de cualquiera de ellos. Entonces, podemos decir que dos sustratos son *complementarios* si satisfacen distintos requerimientos nutricionales y con ello el crecimiento es imposible en ausencia de cualquiera de ellos.

En años recientes han surgido modelos matemáticos que describen aspectos fisiológicos del crecimiento microbiano. Hanegraaf *et al.* (2000), desarrollaron un modelo que describe el mecanismo respiro-fermentativo de una levadura. El modelo toma en cuenta la presencia de múltiples rutas de asimilación de la fuente de

carbono y su respuesta ante diferentes concentraciones de sustrato. Sin embargo, estos modelos solo son para cultivos puros, de ahí la importancia de desarrollar nuevos modelos que nos permitan mejorar y entender estos importantes fenómenos enológicos.

CONCLUSIONES

El mercado actual demanda no solo una calidad homogénea en los productos sino una alta calidad y un bajo precio. El estudio, el modelado y el análisis dinámico de los procesos de fermentación basados en cultivos mixtos permitirían no solo elucidar los mecanismos para influir en las propiedades organolépticas del producto final, sino también desarrollar estrategias para su control automático a nivel industrial. Estas herramientas conducirán al desarrollo de métodos sistemáticos de producción que permitan el desarrollo de productos homogéneos a lo largo de los años.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Haret Rosu, al Dr. Juan Osuna y a los árbitros cuyos certeros comentarios no hicieron más que enriquecer este trabajo.

REFERENCIAS

- Abbott JA (1999) Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biol. Tec.* 15: 207-225.
- Akubor PI, Obio SO, Nwodomere KA, & Obiomah E (2003) Production and quality evaluation of banana wine. *Plant Food Hum. Nutr.* 58: 1-6.
- Akubor PI (1996) The suitability of African bush mango juice for wine production. *Plant Food Hum. Nutr.* 49: 213-219.
- Aris R & Humphrey AE (1977) Dynamics of a chemostat in which two organisms compete for a common substrate. *Biotechnol. Bioeng.* 19: 1375-1386.
- Arthey D & Ashurst PR (1997) Procesado de frutas. Acribia SA, Zaragoza, España.

- Brandt WB, Kelpin DLF, van Leeuwen MMI & Kooijman ALMS (2004) Modelling microbial adaptation to changing availability of substrates. *Water Res.* 38: 1003-1013.
- Ciani M & Maccarelli F (1998) Enological properties of *non-Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 199-203.
- Clemente-Jimenez JM, Mingorance-Cazorla L, Martínez-Rodríguez S, Las Heras-Vázquez FJ & Rodríguez-Vico F (2005) Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 98: 301-308.
- De León-Rodríguez A, González-Hernández L, Barba de la Rosa AP, Escalante- Minakata P & López, MG (2006) Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from Agave Salmiana. *J. Agric. Food Chem.* 54: 1337-1341.
- Días RG & Wachter RC (2003) Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev. Latin. Microbiol.* 45: 30-40.
- Elf J, Paulsson J, Berg OG & Ehrenberg M (2003) Near-Critical Phenomena in Intracellular Metabolite Pools. *Biophys. J.* 84: 154-170.
- Erten H (2002) Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 373-378.
- Escalante-Minakata P, Ibarra-Junquera V, González-García R, De León-Rodríguez A & Rosu HC (2006) On-line monitoring of Mezcal fermentation based on redox potential measurements *Sometido a Biochem. Eng. J.* (Disponible en http://arxiv.org/PS_cache/q-bio/pdf/0609/0609049.pdf)
- da Silva-Filho EA, Brito DSK, do Monte RA, Falcão de Moraes JO, de Moraes Jr MA & Ardaillon DS (2005) Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek.* 88: 13-23.
- Ferreira V (2002) Uva, levadura, y aditivos de fermentación. ¿Quién es quién en la formación de los aromas del vino blanco? Perspectivas de control y mejora. *XX Congreso Internacional del Cava*, Sant Sadurní d'Anoia, España, s/p.
- Fleet GH (2003) Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 11-22
- Gil JV, Mateo JJ, Jiménez M, Pastor A & Huerta T (1996) Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts. *J. Food Sci.* 61: 1247-1249.
- Goff SA & Klee HJ (2006) Plant Volatile Compounds: Sensory Cues for Health and Nutritional Value? *Science.* 311: 815-819.
- Gómez E & Ledbetter CA (1997) Development of volatile compounds during fruit maturation: characterization of apricot and plum apricot hybrids. *J. Sci. Food Agric.* 74: 541-546.
- Granchi L, Ganucci D, Messini A & Vincenzini M (2002) Enological properties of *Hanseniaspora osmophila* and *Kloeckera corticis* from wines produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes. *FEMS Yeast Res.* 2: 403-407.
- Hanegraaf PPF, Stouthamer AH & Kooijman ALM (2000) A mathematical model for yeast respiratory physiology. *Yeast.* 16: 423-437.
- Hansen SR & Hubbell SP (1980) Single nutrient microbial competition: agreement between experimental and theoretical forecast outcomes. *Science.* 207: 1491-1493.
- Herraiz T, Martín-Alvarez PJ, Reglero G, Herraiz M & Cabezudo MD (1989) Differences between wines fermented with and without SO₂ using various selected yeasts. *J. Sci. Food Agric.* 49: 249-258.
- Ibarra-Junquera V, Escalante-Minakata P, Murguía JS & Rosu HC (2006) Inferring mixed-culture growth from total biomass data in a wavelet approach. *Physica A.* 370: 777-792.
- Joao ML, Días LS, Serafin PC, Lemos MA, Reis M & Oliveira R (2005) Mathematical modeling of

- mixed culture cultivation process for the production of polyhydroxybutyrate. *Biotech. Bioeng.* 92: 209-222.
- León JA & Tumpson DB (1975) Competition between two species for two complementary or substitutable resources. *J. Theor. Biol.* 50: 185-201.
- Lilly M, Lambrechts MG & Pretorius IS (2000) Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 744-753.
- Lund ST & Bohlmann J (2006) The molecular basis for wine grape quality - A volatile subject. *Science*, 311: 804-805.
- Mateo JJ, Jiménez M, Huerta T & Pastor A (1991) Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine. *Int. J. Food Microbiol.* 14: 153-160.
- Moreno JJ, Millán C, Ortega JM, & Medina M (1991) Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *J. Ind. Microbiol.* 7: 181-190.
- Nally MC, Maturano YP, Vázquez F & Too ME (2005) Comportamiento de una cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae* killer y su isogénica sensible respecto de diferentes fuentes de nitrógeno en cultivos mixtos. *Rev. Argent. Microbiol.* 37: 73-77.
- Nielsen J, Villadsen J & Liden G (2003) Bioreaction Engineering Principles. Kluwer Academic Plenum Publishers, USA.
- Onwuka UN & Awam FN (2001) The potential for baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in the production of wine from banana, cooking banana and plantain. *Food Serv. Technol.* 1: 127-132.
- Powell EO (1958) Criteria for the growth of contaminants and mutants in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 18: 259-268.
- Querol A, Barrio E & Ramón D (1994) Population dynamics of wine yeast strains in natural fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 315-323.
- Querol A, Barrio E & Ramón D (1992) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2948-2953.
- Reddy LVA & Reddy OVS (2005) Production and characterization of wine from mango fruit (*Mangifera indica* L). *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1345-1350.
- Riu AM (2005) Caracterización de compuestos volátiles en bebidas derivadas de fruta. Tesis de grado de Doctor en Ciencias, Universidad de Barcelona, España.
- Rojas V, Gil JV, Piñaga F & Manzanares P (2001) Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 283-289.
- Romano P & Suzzi G (1993) Sulphur dioxide and wine microorganisms. In: Wine Microbiology and Biotechnology. Fleet G H (ed). Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 373-394.
- Romano P, Suzzi G, Comi G & Zironi R (1992) Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 126-130.
- Romano P, Suzzi G, Comi G, Zironi R & Mainfreni M (1997a) Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 82: 615-618.
- Romano P, Suzzi G, Domizio P & Fatichenti F (1997b) Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71: 239-242.
- Romano P, Suzzi G, Zironi R & Comi G (1993) Biometric study of acetoin production in *Hanseniaspora guilliermondii* and *Kloeckera apiculata*. *Appl. Environmental Microbiol.* 59: 1838-1841.
- Ruiz Hernández M & Martínez Garoña M (1997) *Curso popular de cata de vinos*. Edita: Gobierno de la Rioja, Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, España.

- Schink B (2002) Synergistic interactions in the microbial world. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 257-261.
- Tilman D (1977) Resource competition between planktonic algae: an experimental and theoretical approach. *Ecology* 58: 338-348.
- Torija MJ, Rozes N, Poblet M, Guillamon JM & Mas A (2001) Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79: 345-352.
- Toro ME & Vázquez F (2002) Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 351-358.
- Marshall VM (1987) Lactic acid bacteria: starters for flavour. *FEMS Microbiol. Lett.* 46: 327-336.
- Zironi R, Romano, P, Suzzi G, Battistutta F & Comi G (1993) Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 15: 235-238

Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos

Zahaed Evangelista-Martínez* y Angélica Moreno-Enríquez.

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

México D.F. 04510. E-mail: zahaedem@yahoo.com

Palabras clave: Actinomicetos, metabolitos secundarios, productos bacterianos naturales.

RESUMEN

El advenimiento de la moderna biotecnología abrió por completo nuevas perspectivas para el uso de microorganismos como generadores de productos farmacéuticos. A la vista de la inmensa variedad de grupos de genes biosintéticos de productos naturales que ahora son accesibles a través de la secuenciación de alto rendimiento, es deseable establecer tecnologías eficientes de modificación, transferencia y expresión. Los métodos que la ingeniería genética provee pueden ser utilizados para la producción de productos naturales derivados de microorganismos de lento crecimiento o incluso de aquellos que no se pueden cultivar. Estos métodos pueden modificar genes biosintéticos o insertar genes específicos dentro del ADN de una cepa productora de antibióticos para obtener metabolitos secundarios modificados. Aunado a lo anterior, nuevos metabolitos se pueden obtener por combinar al azar los genes de dos o más grupos de genes que tienen influencia en rutas biosintéticas similares. El presente artículo describe brevemente diferentes clases de sustancias médicamente útiles producidas por actinomicetos con aplicaciones farmacológicas. Además, se mencionan los efectos de algunos compuestos sobre diferentes organismos y la bacteria que lo produce.

Key words: Actinomycetes, secondary metabolites, bacterial natural products.

ABSTRACT

The advent of modern biotechnology opened totally new perspectives for the use of microorganisms as producers of pharmaceutical products. In light of the immense variety of natural product biosynthetic gene clusters that are becoming accessible through high-throughput sequencing, it is highly desirable to establish efficient modification, transfer and expression technologies. The methods provided by the genetic engineering can be used for the production of natural products derived from slow-growing or even uncultured microorganisms. These methods could alter biosynthetic genes or insert selected genes into the DNA of an antibiotic-producing strain for obtaining modified secondary metabolites. Moreover, a number of new metabolites could be obtained by randomly combining the genes of two or more gene clusters governing similar biosynthetic pathways. The present article briefly describe the various classes of medically useful substances produced by actinomycetes with pharmacological applications. Furthermore, specifications are given on the effects of some compounds on different organisms and the bacteria producer.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos viven en ambientes naturales, donde su crecimiento es afectado tanto por interacciones con otras poblaciones (sinérgicas, antagónicas, etc.) como por las características físicas y químicas de su entorno. Como consecuencia de esas interacciones, se producen metabolitos secundarios con actividades biológicas

variadas, que juegan un papel importante en su sobrevivencia.

En contraste a los metabolitos secundarios producidos por las plantas, cuyo uso contra enfermedades tiene sus raíces en la medicina tradicional, los compuestos de importancia farmacéutica obtenidos de microorganismos son el resultado de intensas investigaciones de la naturaleza como fuente de compuestos bioactivos llevados a cabo por un gran número de laboratorios en todo el mundo. La identificación y caracterización biológica y molecular de microorganismos útiles como agentes de biocontrol, productores de compuestos bioactivos o sustitutos de antibióticos, ha sido de gran interés para la medicina y la agricultura moderna. En este contexto se han evaluado microorganismos, se han aislado y caracterizado química y biológicamente sus metabolitos secundarios, y se ha estudiado el papel que estos juegan en el control de enfermedades y en las respuestas de defensa (Martín, 2003; National Research Council (NRC), 2003 www.item.ba.crr.it/biopesti.htm.)

Originalmente la búsqueda de compuestos útiles se realizaba siguiendo varios pasos, entre los cuales se pueden mencionar los siguientes: 1) coleccionar sistemáticamente microorganismos del suelo, 2) crecerlos en cultivos axénicos, 3) probar la capacidad de los medios donde crecían los microorganismos para inhibir el crecimiento de organismos patógenos, y 4) recuperar las sustancias activas producidas por los microorganismos.

De esta búsqueda se obtuvo que los actinomicetos eran los organismos que con mayor frecuencia producían compuestos inhibidores del crecimiento de bacterias patógenas, en particular cerca del 50% de las cepas aisladas de *Streptomyces* presentan algún compuesto activo principalmente contra bacterias Gram-positivas. De tal manera que al inicio de los años sesenta se descubrieron miembros de las principales familias de antibióticos clínicamente útiles. Con excepción

de las penicilinas, cefalosporinas y algunos productos menores, todos eran producidos por los actinomicetos. De manera colectiva su espectro de acción cubría prácticamente todos los patógenos bacterianos importantes (www.bib.gbf.de/ergebnisbenisberech/1997/english/section-c/c3/c3english.htm). Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de compuestos aislados, surgió la necesidad de una revisión a fondo de los objetivos y los métodos para buscar compuestos útiles. Esto se dio por el hecho de que el número de antibióticos aislados fue tal que la competencia por descubrir nuevos compuestos se volvió cada vez más frecuente. Sin embargo, considerando la dificultad y costos elevados de aislar nuevas estructuras y agentes antimicrobianos con formas novedosas de actuar, el descubrimiento de nuevos compuestos entró en una fase de decaimiento acelerado (DiMasi *et al.*, 1994), sobretodo si se toma en cuenta que la probabilidad de encontrar en los microorganismos compuestos bioactivos útiles es de 1 por cada 10,000 cultivos examinados por los métodos microbiológicos tradicionales (Clark, 1996).

En este sentido, la búsqueda de compuestos activos comenzó a dar un giro importante, principalmente teniendo como objetivo la búsqueda de compuestos contra hongos, virus o cepas bacterianas resistentes a antibióticos.

Por lo tanto, la estrategia de búsqueda de metabolitos novedosos se cambió lentamente en muchos laboratorios, tomando en cuenta que menos del 1% de las especies bacterianas y menos del 5% de las especies de hongos son conocidas, y que millones de especies microbianas permanecen desconocidas, por lo que es grande el potencial de los microorganismos como proveedores de compuestos bioactivos útiles (Yung, 1997), algunos de ellos han optado por métodos de búsqueda masiva de microorganismos inusuales o raros (como algunos actinomicetos) u organismos que viven en ambientes marinos peculiares, principalmente en ambientes de temperatura

extrema o de elevadas presiones (www.febras.ru/vpiboc/english/newpsoe1.htm; Carte, 1996). Otros grupos han enfocado su investigación a la búsqueda de nuevos sitios blanco de los compuestos ya conocidos, en vez de aislar nuevos organismos productores. El resultado de todo ello ha sido el descubrimiento de agentes antimicrobianos nuevos e importantes, sustancias con actividad antitumoral e inhibidores de enzimas de mamíferos de potencial interés farmacéutico, entre otros compuestos.

Sin embargo, a pesar de contar con un número importante de metabolitos, se requiere de nuevos productos que cubran diferentes necesidades en las áreas médica, agrícola y alimenticia. Por ejemplo, en la medicina se requiere de nuevos productos debido a: 1) el desarrollo de resistencia de microorganismos patógenos, 2) la aparición de nuevas enfermedades (SIDA, virus Hanta, virus del Ébola, enfermedad de Lyme, *Escherichia coli* 0157:H7, entre otras), 3) la existencia de bacterias resistentes naturalmente y 4) la toxicidad de algunos compuestos actualmente en uso (Demain, 1999); en la agricultura se requiere de compuestos útiles para combatir bacterias, virus, insectos y nematodos fitopatógenos; para la nutrición animal se requiere de compuestos que puedan utilizarse para la preservación de alimentos.

Los progresos de la biotecnología moderna han abierto nuevas perspectivas para el uso de microorganismos como productores de metabolitos con aplicaciones farmacéuticas, auxiliándose de la ingeniería genética como herramienta que provee de nuevos métodos para la obtención de metabolitos secundarios modificados que cubran las necesidades actuales.

METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR ACTINOMICETOS

Los metabolitos secundarios producidos por bacterias son moléculas relativamente pequeñas producidas por un número limitado de cepas, que al parecer no tienen una función determinada en el

crecimiento celular. De hecho, las cepas productoras de éstos, que por alguna mutación han perdido su capacidad de producirla, presentan crecimiento y características normales. Estos metabolitos incluyen diferentes tipos de compuestos de importancia económica, dentro de los cuales se encuentran los antibióticos, pigmentos, toxinas, feromonas, inhibidores enzimáticos, agentes inmunomoduladores, antagonistas y agonistas de receptores, pesticidas, agentes antitumorales y promotores del crecimiento en animales y plantas. Esta gran variedad de compuestos producidos en la naturaleza se ve reflejada en cerca de los más de 23,000 metabolitos microbianos conocidos, de los cuales el 42% los producen hongos, 32% actinomicetos y el resto producidos por otros grupos de bacterias (Lazzarini *et al.*, 2000).

En el caso de los actinomicetos, es ampliamente reconocida la capacidad que tienen de producir una gama muy variada de metabolitos secundarios (Baltz & Hosted, 1996), algunos de los cuales se describen a continuación y que son relevantes por su uso como fármacos.

1. Antibióticos

Los metabolitos microbianos más importantes son los antibióticos, sustancias que a bajas concentraciones inhiben el crecimiento de diferentes especies de microorganismos y que ejercen su mayor efecto sobre la salud, nutrición y economía de la sociedad. Un aspecto importante es el gran número de antibióticos existentes, de los aproximadamente 8,000 reportados hasta 1999, 45.6% eran producidos por estreptomicetos, 16% por otros actinomicetos, 16.9% por otras bacterias y 21.5% por hongos (Lazzarini *et al.*, 2000). Otro aspecto importante de los antibióticos se refiere a la variedad de estructuras químicas que presentan, en donde todas las clases de moléculas de la química orgánica están representadas: cadenas alifáticas, anillos aromáticos aislados o condensados, anillos

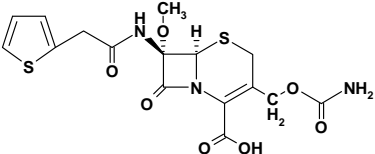
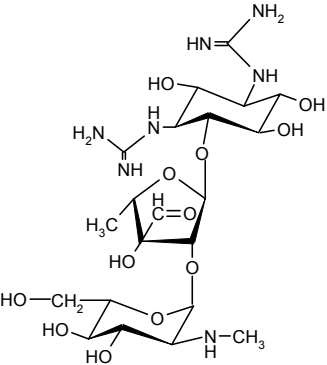
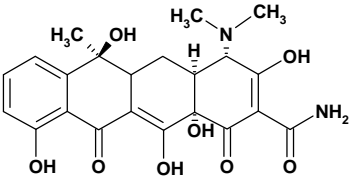
heterocíclicos, oligopéptidos y oligosacáridos entre otros muchos más.

La propiedad que hace que los antibióticos sean considerados como “fármacos maravillosos”, es la selectividad de su mecanismo de acción, que los distingue de germicidas y desinfectantes sintéticos. Su toxicidad selectiva contra algunas clases de organismos, con pocas excepciones, los ha convertido en los compuestos más utilizados para la terapia contra microorganismos patógenos. Esto ha significado que las ventas de algunos de estos compuestos superen los 23 billones de dólares, ventas relacionadas a no más de 300 productos

naturales, semisintéticos o sintéticos, que incluyen cefalosporinas, penicilinas, quinolonas, tetraciclinas y macrólidos (Strohl *et al.*, 1991).

Los antibióticos se agrupan en familias, caracterizadas porque agrupan compuestos que tienen una estructura química similar y comparten el mismo mecanismo de acción antimicrobiano (Lancini *et al.*, 1995). De manera breve se describen algunos de los antibióticos producidos por actinomicetos. La tabla 1 muestra los principales antibióticos, su estructura química y el sitio donde actúan.

Tabla 1. Clasificación de los principales antibióticos producidos por actinomicetos de acuerdo a su estructura química.

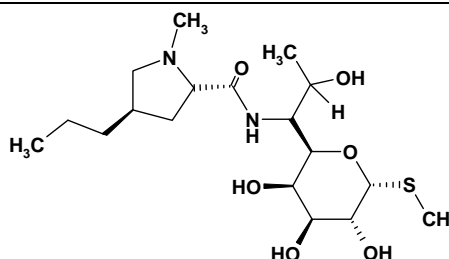
CLASIFICACION	ANTIBIÓTICO	ESTRUCTURA
β-Lactámicos	Cefoxitina. (Cefamicina semisintética). Inhibe síntesis de pared celular.	
Aminoglucósidos	Estreptomicina. Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 30S.	
Tetraciclinas	Tetraciclina. Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 30S.	

Macrólidos	<p>Eritromicina.</p> <p>Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 50S.</p>	
Polienos	<p>Amfotericina B.</p> <p>Alteración de permeabilidad en la membrana.</p>	
Glicopéptidos	<p>Vancomicina.</p> <p>Inhibe síntesis de pared celular.</p>	
Rifamicinas	<p>Rifampicina.</p> <p>Inhibición de síntesis de RNA. Unión a la RNA polimerasa.</p>	
Fenicoles	<p>Cloranfenicol.</p> <p>Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad 50S.</p>	

Lincomicina.

Azúcares
complejos

Inhibe síntesis de
proteínas.
Unión en la subunidad
50S.



Las estructuras químicas de los metabolitos secundarios se diseñaron empleando el programa MDL ISIS DRAW versión 2.5 (http://www.mdl.com/products/framework/isis_draw/index.jsp).

Antibióticos β -Lactámicos. La estructura química típica de estos antibióticos es la presencia de cuatro anillos unidos por un enlace amida, compuestos que son activos sobre un gran número de bacterias inhibiendo el ensamblaje de los componentes de peptidoglicano de la pared celular. Los hongos son los que producen los antibióticos clásicos (penicilina y cefalosporina); sin embargo, algunas bacterias pueden producir cefalosporinas modificadas como la cefamicina.

La tienamicina, producida por *Streptomyces cattleya* es de los últimos antibióticos comerciales que se usa y uno de los más potentes, con un amplio espectro de acción contra bacterias aerobias y anaerobias, Gram-positivas y Gram-negativas incluyendo *Pseudomonas*. A pesar de que es un antibiótico beta lactámico, no es un miembro de las penicilinas o cefalosporinas, más bien es un carbapenemo (Demain, 1999), que difiere de los beta lactámicos convencionales por la presencia de un átomo de carbono en lugar de azufre en el anillo condensado al anillo lactámico y por la configuración *trans* de los átomos de hidrógeno del anillo lactámico (Kahan *et al*, 1979).

Aminoglucósidos. Químicamente estos compuestos son oligosacáridos que comprenden aminoazúcares y un residuo aminociclitol, que es un anillo de seis miembros alicíclico con sustituyentes hidroxilo y amino. Son activos

principalmente contra bacterias Gram-negativas, inhibiendo de manera irreversible la síntesis de proteínas. El producto principal de esta familia es la estreptomina producida por *Streptomyces griseus*, y la gentamicina producida por *Micromonospora purpurea*.

Tetraciclinas. Este grupo de antibióticos se componen de cuatro anillos de seis átomos arreglados linealmente. Estos compuestos de amplio espectro actúan inhibiendo la síntesis de proteínas a nivel ribosomal, actuando sobre la subunidad ribosomal 30S. A nivel clínico se usa la oxitetraciclina producida por *Streptomyces rimosus* y la tetraciclina y clortetraciclina producidas por *S. aureofaciens*.

Macrólidos. Esta familia de antibióticos incluye un gran número de compuestos caracterizados por un anillo de lactona de 12 a 16 átomos de carbono y que contiene dos o más azúcares. El miembro representativo de este grupo y el más conocido es la eritromicina, compuesto que es producido por *Saccharopolyspora erythraea* y que inhibe la síntesis de proteínas, uniéndose a la subunidad ribosomal 50S.

Polienos. Estos macrólidos antifúngicos difieren de los macrólidos antibacterianos en el tamaño del anillo de lactona, que varía de 26 a 38 átomos, y en

la presencia de una serie de dobles enlaces conjugados. El compuesto sistemáticamente utilizado es la anfotericina B producida por *Streptomyces nodosus*, cuya actividad antifúngica se debe a que interfiere con los esteroides de membrana alterando su permeabilidad.

Glicopéptidos. Entre el gran número de compuestos pertenecientes a esta familia de antibióticos, los más empleados son los antibióticos llamados "dalbaheptidos", denominación que se debe a su mecanismo de acción (**D-alanina-D-alanina binding**) y a su composición (**heptapeptidos**). Los antibióticos más conocidos de este grupo son vancomicina y teicoplanina, producidos por *Amycolatopsis orientalis* y *Actinoplanes teichomyceticus* respectivamente.

Rifamicinas. Esta familia de compuestos pertenece a la extensa clase de compuestos llamados ansamicinas, que son moléculas caracterizadas por presentar un núcleo aromático atravesada por una cadena alifática. Su mecanismo de acción se da a través de la inhibición de la síntesis de RNA al unirse a la RNA polimerasa. Industrialmente la rifamicina B y rifamicina SV son producidas por *Amycolaptosis mediterranei*, compuestos que son usados como materia prima para producir de manera semisintética rifampicina o rifapentina.

Fenicoles. En este grupo de compuestos se encuentra el cloranfenicol, antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad ribosomal 50S, bloqueando la formación del enlace peptídico al inhibir la actividad de peptidil transferasa. Este compuesto se aisló de *Streptomyces venezuelae* aunque actualmente se produce por síntesis química.

Azúcares complejos. En este grupo se encuentran los antibióticos lincomicina y su

derivado clindamicina. La lincomicina se aisló de *Streptomyces lincolnensis*, y al igual que el cloranfenicol inhibe la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad ribosomal 50S afectando la actividad de peptidil transferasa.

Se ha visto que compuestos con actividad antibiótica también presentan otras actividades importantes (Demain, 1983), algunos de los cuales han sido discretamente explotados en el pasado, pero que deberían ser explotados en el futuro. En este sentido se ha llevado a cabo una amplia búsqueda de antibióticos activos contra organismos diferentes a microorganismos, así como compuestos con otras aplicaciones farmacológicas aplicadas a enfermedades que actualmente son tratadas sólo con compuestos sintéticos. Se han identificado compuestos bioactivos con diversas aplicaciones en el campo de la medicina, algunos de ellos se describen a continuación y se presentan en la Fig. 1.

II. Agentes antitumorales.

La mayoría de los compuestos usados para quimioterapia de tumores son antibióticos producidos por actinomicetos (Tomasz, 1995), dentro de los que se encuentran actinomicina D, mitomicina, bleomicina, neomicina y las antraciclinas, daunorubicina y doxorubicina (Demain, 1999). Por ejemplo, en humanos la neomicina inhibe angiogénesis inducida por angiogenina en células endoteliales (Hu, 1998), mecanismo que al parecer actúa vía la capacidad de la neomicina para inhibir la fosfolipasa C. Sorprendentemente, otros aminoglucósidos como la gentamicina, estreptomina, kanamicina, amikacina y paronomina no tienen la propiedad antitumoral, a pesar de que entre algunos de estos compuestos exista una pequeña diferencia; por ejemplo, la paronomina difiere de la neomicina solamente porque presenta un OH^- en la posición 6 de la

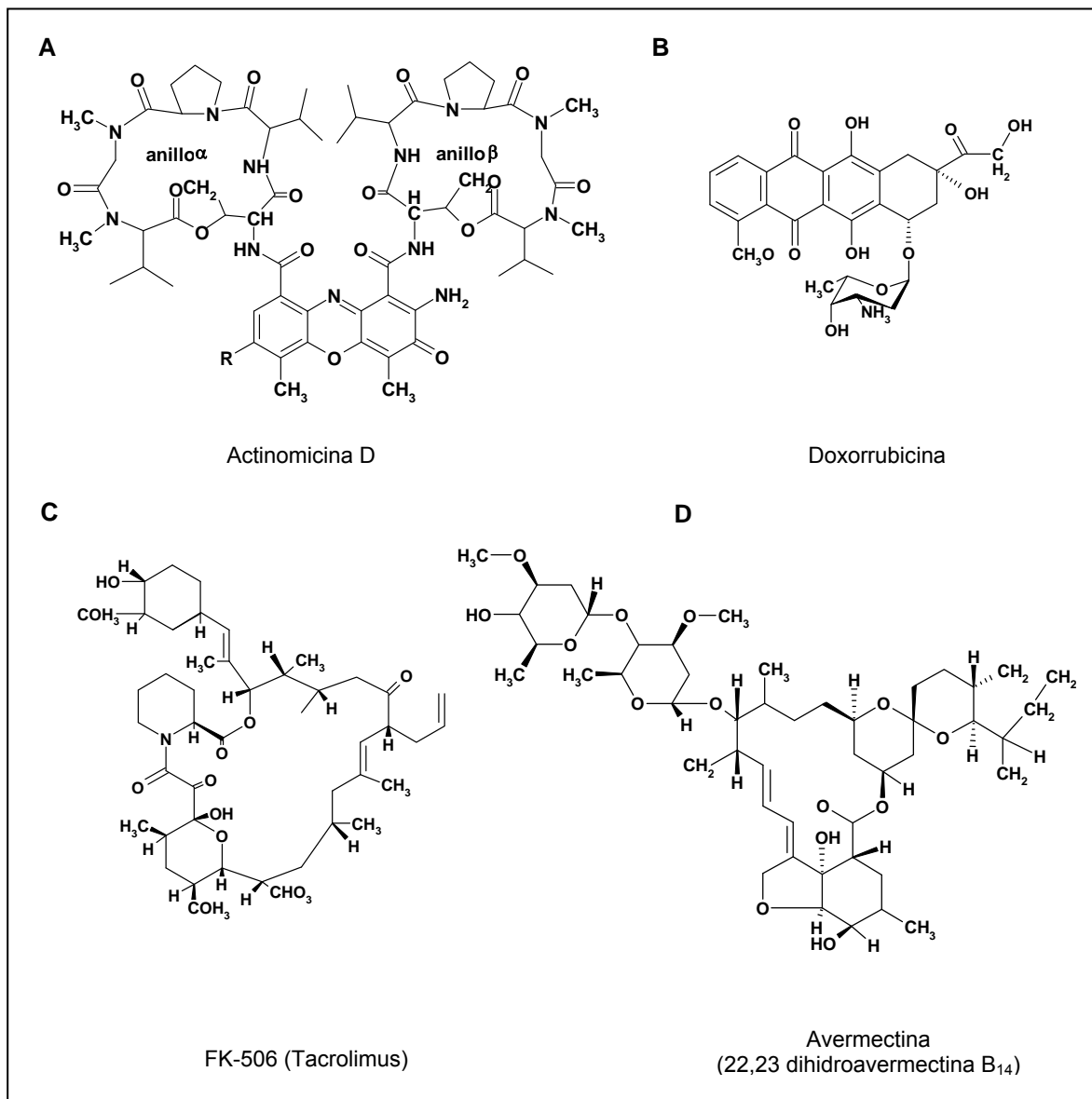


Fig. 1. Metabolitos secundarios producidos por *Streptomyces* con actividades antitumoral (A,B), inmunosupresora (C) y contra parásitos (D).

glucosa en lugar de un grupo -NH₂.

Por su parte, la actinomicina D es un antibiótico polipeptídico aislado de *Streptomyces*, al que se le reconoció actividad anticancerígena, aunque debido a su elevada toxicidad no es un compuesto muy usado. Sin embargo, es ampliamente utilizado en investigación de biología celular para inhibir la transcripción al unirse al DNA en el complejo de

inicio de la transcripción, evitando la elongación del RNA por la RNA polimerasa (Sobell, 1985).

III. Agentes Inmunosupresores.

Durante muchos años la ciclosporina A, originalmente descubierta como un péptido antifúngico de espectro de acción limitado producido por un hongo (Pritchard, 2005), se

empleó como agente inmunosupresor en pacientes que recibían trasplantes de corazón, riñón e hígado (Demain, 1999). Sin embargo, dos productos producidos por actinomicetos han dado buenos resultados como inmunosupresores. Tal es el caso de los policétidos FK-506 (tacrolimus) (Kino *et al*, 1987), aislado de *Streptomyces tsukubaensis* y de la rapamicina (Sirolimus) (Vezina *et al*, 1975) aislado de *Streptomyces hygroscopicus*. El uso de FK-506, tracolimus o Prograf su nombre comercial, fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en 1994 para usarse en un principio en pacientes sometidos a trasplante de riñón y posteriormente para trasplantes de hígado, corazón, páncreas, tráquea, piel y córnea. La rapamicina originalmente se empleó como agente antifúngico, aunque se dejó de utilizar como tal una vez que se descubrió que tenía propiedades inmunosupresoras y antiproliferativas.

El mecanismo de acción de estos inmunosupresores ha ayudado a incrementar el conocimiento acerca de la activación y proliferación de las células T (Demain, 1999). En el caso de FK-506, este antibiótico macrólido actúa interaccionando con una proteína intracelular (inmunofilina, FKBP-12), formando un complejo (FKBP-12-FK506) el cual interacciona e inhibe a la calcineurina inhibiendo los eventos de transducción de señales de los linfocitos T y la transcripción de IL-2 (Liu *et al*, 1991).

IV. Compuestos antiparásitos.

Una de las enfermedades con efectos económicamente importantes en la avicultura es la coccidiosis, enfermedad causada por el protozoario *Eimeria*. Por mucho tiempo esta enfermedad fue exclusivamente combatida con compuestos sintéticos; sin embargo, debido a que el parásito desarrollaba rápidamente resistencia al tratamiento se desarrollaron nuevos compuestos sintéticos con actividad coccidiostática. Sorprendentemente, se encontró un antibiótico tóxico parenteralmente y de espectro de acción estrecho, la monensina, que

presenta alta toxicidad contra los coccidios. A pesar de este descubrimiento, el proceso fermentativo para producir este políéter debería ser mejorado a niveles en que producirlo resultara económicamente viable. Para ello, la genética y la ingeniería bioquímica jugaron un papel trascendental ya que se logró mejorar el proceso de fermentación, teniendo como resultado que hoy día los políéteres monensina (producido por *Streptomyces cinnamonensis*), lasalócido (producido por *Streptomyces lasaliensis*) y salinomicina (producido por *Streptomyces albus*) dominan la producción de coccidiostáticos comerciales (Westley, 1977).

Otro problema importante en el campo veterinario han sido las enfermedades causadas por helmintos en los animales de granja. En un inicio la principal forma de obtener compuestos con actividad antihelmíntica se realizaba probando diferentes compuestos sintéticos contra nemátodos, de los cuales algunos presentaban dicha actividad. Por otra parte, se habían encontrado algunos antibióticos que poseían actividad antihelmíntica contra nematodos y cestodos, aunque resultaron menos eficientes que los compuestos sintéticos. Posteriores búsquedas de cultivos microbianos con actividad antihelmíntica, produjeron un cultivo fermentativo no tóxico que mataba al nemátodo (*Nematosporeoides dubius*), patógeno intestinal del ratón. El cultivo de *Streptomyces avermitilis*, el cual fue aislado por Omura y su equipo en el Instituto Kitasato de Japón (Ikeda & Omura, 1997), producía una familia de metabolitos secundarios que presentaba actividades antihelmínticas e insecticidas, los cuales se denominaron "avermectinas". Estos metabolitos son disacáridos derivados de lactonas macrocíclicas, con una excepcional actividad contra parásitos, siendo al menos diez veces más potente que cualquier agente antihelmíntico sintético conocido. A pesar de su estructura macrólida, las avermectinas no tienen actividad contra bacterias y hongos, no inhiben síntesis de proteínas ni son ionóforos; en lugar de

ello su actividad está relacionada con interferir con la neurotransmisión en muchos vertebrados, teniendo actividad contra nematodos y artrópodos parásitos de ovejas, vacas, perros, caballos y cerdos. Un derivado semisintético, 22,23-hidroavermectina B1 (Ivermectina) es unas cien veces más potente que el tiobenzol y es un producto veterinario comercial (Demain, 1999)

Diferentes derivados de las avermectinas han sido obtenidos, un ejemplo interesante de esto es la "Doramectina" (ciclohexil-avermectina B1) desarrollada por el método de biosíntesis mutacional (Stutzman-Engwall *et al*, 2001), siendo el primer ejemplo de un producto comercial desarrollado de esta manera. Naturalmente, la avermectina contiene cadenas laterales de 25 carbonos de 2-metil butiril o isobutiril, grupos que son adicionados por la 2-cetoácido deshidrogenasa a partir de isoleucina y valina, respectivamente (Chen *et al*, 1989). La eliminación del gen *bkd*, que codifica para la 2-cetoácido deshidrogenasa, evita que los cultivos produzcan avermectina a menos de que se le adicione al cultivo ácido isobutírico o ácido (S)-2-metilbutírico, o bien añadiendo otros ácidos grasos, lo que permite obtener nuevos derivados de avermectinas (Dutton *et al*, 1991). En este sentido, se han probado más de 800 ácidos grasos produciéndose 60 avermectinas incluyendo la ciclohexil-avermectina B1 (Doramectina).

INGENIERIA GENÉTICA DEL METABOLISMO SECUNDARIO DE ACTINOMICETOS.

Desde sus inicios la genética ha estado íntimamente relacionada con la producción de compuestos de origen bacteriano, lográndose incrementar la productividad de las fermentaciones, aunque también incrementando los costos de operación de las mismas, incrementos que tienen que ver con procesos de mutagénesis y de búsqueda de cepas de bacterias con una alta producción. Sin embargo, en años recientes la miniaturización, automatización de los procedimientos de búsqueda y el desarrollo de

métodos de selección para obtener cepas mejoradas, han auxiliado en gran medida al desarrollo de nuevos productos.

La mutación, como método elegido para obtener nuevos productos ha servido para: a) elevar la proporción de metabolitos producidos en el cultivo a una proporción más favorable, b) elucidar las rutas de biosíntesis del metabolismo secundario y c) producir nuevos compuestos.

El potencial de la tecnología de DNA recombinante utilizada en mejorar los antibióticos o descubrir nuevos se ha incrementado notablemente, sobretodo porque se ha venido encontrando que los genes de las rutas biosintéticas de los antibióticos se encuentran agrupados con los genes de resistencia para ese antibiótico. Este arreglo facilita la transferencia de una ruta completa en un solo paso y cuando se aplica a las fermentaciones se tiene una sobreproducción de las enzimas importantes de esa ruta biosintética, incrementando de esa manera la producción del compuesto final.

Muchos de estos compuestos pertenecen a productos que pertenecen a las familias de péptidos no ribosomales y de policétidos, sintetizados por sistemas enzimáticos conocidos como policétido sintasa (PKS) y sintasa de péptidos no-ribosomales (NRPSs) (Stauton & Weissman, 2001).

Tomando en cuenta que muchos de los compuestos conocidos han sido aislados de microorganismos difíciles de cultivar, que crecen muy lentamente o inclusive no se pueden cultivar (Fortman & Sherman, 2005), surge el interés de transferir la vía de biosíntesis de los compuestos a un hospedero fácil de crecer y manejar y que se considera una buena alternativa para producir altas cantidades del compuesto deseado, o bien, puede proveer de las bases para posteriores estudios de biosíntesis combinatoria.

Existen un gran número de ejemplos de la producción heteróloga de metabolitos secundarios específicos. Las estrategias empleadas varían desde la transformación directa de pequeños

clusters de antibióticos dentro de una bacteria relacionada a la ingeniería de DNA de grandes rutas biosintéticas.

En el caso de la expresión heteróloga de rutas biosintéticas de estreptomicetos en actinomicetos relacionados, se tiene el caso del sistema PKS tipo II de la producción de medermicina en *Streptomyces coelicolor* (Ichinose *et al.*, 2003). En este ejemplo, el cluster biosintético está contenido en un cósmido de aproximadamente 40 kb de los cuales 3 son propios del cluster, que es directamente transformado a una cepa apropiada (*S. lividans* y *S. coelicolor*), producción que depende del promotor original y sus elementos regulatorios.

Cuando la ruta de biosíntesis está contenida en clusters que son más grandes que lo que puede mantener un cósmido o los vectores BAC, la biosíntesis del compuesto se obtiene al coexpresar varios plásmidos, cada uno conteniendo una parte de la ruta de biosíntesis del compuesto (Kao *et al.*, 1994).

Pero, cuando lo que se busca es utilizar este conocimiento para modificar específicamente una ruta del producto final se realiza mutagénesis dirigida (targeted mutagenesis) en un cósmido o en un sistema de expresión BAC usando el sistema Red/ET, para producir compuestos relacionados entre sí que tengan la particularidad de que las pequeñas diferencias entre ellos les confiera una función diferente (Zhang *et al.*, 2000). La viabilidad de este método se demostró al generar un nuevo derivado de aureothina con una mejor actividad (Fig. 2) (Ziehl *et al.*, 2005). La inactivación de los genes biosintéticos implicados en la formación de la unidad inicial de la aureothina (*p*-nitro-benzoil-CoA) por medio del sistema de recombinación Red/ET y la expresión de la vía de biosíntesis en *Streptomyces lividans*, resultó en mutantes que no producían aureothina; la adición del sustrato *p*-ciano-benzoato a estas mutantes resultó en la producción de un nuevo nitrilo análogo a la

aureothina, el aureonitrilo, el cual presentó una mayor actividad citostática.

CONSIDERACIONES FINALES

Los antibióticos producidos por las bacterias han sido empleados contra las infecciones producidas por bacterias y hongos, muchos de ellos son utilizados comercialmente y otros son potencialmente útiles en otras ramas de la medicina.

Muchos de los metabolitos secundarios producidos por los actinomicetos se emplean como agentes antitumorales, agentes inmunosupresores, inhibidores enzimáticos y agentes contra parásitos. Un buen número de estos fue descubierto inicialmente como un antibiótico que no tuvo un impacto a nivel comercial, muchos de los cuales aún están en espera de que se le encuentre una actividad más importante sobre alguna enfermedad. Esto significa que estos compuestos han ayudado a cambiar nuestras expectativas de vida, revolucionando la medicina al tener una actividad importante en el trasplante de órganos, considerando que más de la mitad de los mejores compuestos farmacéuticos son de origen natural o relacionados a ellos, frecuentemente la molécula por sí misma no tiene un uso como tal, sin embargo puede servir como una molécula a la cual se le puedan realizar modificaciones químicas o genéticas para encontrarle una función.

La biología molecular de las bacterias ha abierto el camino para el desarrollo de la industria biotecnológica, siendo la biología molecular la fuerza que impulsa la investigación farmacéutica. De tal manera que se pueden producir análogos de diversos polipéptidos, una segunda generación de polipéptidos recombinantes modificados para alterar su especificidad, para alterar la especificidad de los sitios blanco; o bien, la tercera generación de péptidos podría fusionar secuencias de diferentes genes para que la liberación de algún fármaco se realice de manera específica.



Fig. 2. Manipulación del cluster de genes de aureothina para producir su derivado aureonitrilo. El gen *aurG* de la *p*-aminobenzoato sintasa fue eliminado del cluster de aureothina contenido en el plásmido de expresión pHJ48 usando el sistema de recombinación Red/ET. El plásmido obtenido (pHJ97) se introdujo en el huésped heterólogo *S. lividans*. La mutante obtenida (*S. lividans* ZX1::pHJ97) no produce aureothina; con la adición al cultivo de *p*-ciano benzoato se produjo el derivado aureonitrilo.

Finalmente, a pesar de que la ingeniería genética de los actinomicetos muchas veces está limitada por barreras de restricción en cuanto a la introducción de DNA a una célula, se han realizado progresos importantes, tan es así que se desarrolló

un cromosoma artificial que tiene la capacidad de transferir hasta 100 kb de DNA.

AGRADECIMIENTOS

Z E-M recibió una beca de CONACYT, México, para realizar estudios de Doctorado (138467) y

parcialmente estuvo apoyado por el Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado de la UNAM (203318); A M-E recibió una beca de CONACYT, México, para estudios de Maestría (189676) y una beca complementaria de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

REFERENCIAS

- Baltz RH & Hosted TJ (1996) Molecular genetic methods for improving secondary-metabolite production in actinomycetes. *TibTech*. 14: 245-250.
- Carte BK (1996) The biomedical potential of marine products. *BioScience* 46: 271-286.
- Chen T, Arison B, Gullo V & Inamine E (1989) Further studies on the biosynthesis of the avermectins. *J. Ind. Microbiol.* 4: 231-238.
- Clark AM (1996) Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceut. Res.* 13:1133-1141.
- Demain AL (1983) New applications of microbial products. *Science* 219: 709-714.
- Demain AL (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52 : 455-463.
- DiMasi J, Seibring M & Lasagna M (1994). New drug development in the United States from 1963 to 1992. *Clin. Pharmacol. Ther.* 55: 609-622.
- Dutton C, Gibson S, Goudie A, Holdom K, Pacey M & Ruddock J (1991) Novel avermectins produced by mutational biosynthesis. *J. Antibiot.* 44: 357-365.
- Fortman JL & Sherman DH (2005) Utilizing the power of microbial genetics to bridge the gap between the promise and the application of marine natural products. *Chem. Bio. Chem.* 6: 960-978.
- Hu GF (1998) Neomycin inhibits angiogenin-induced angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 9791-9795.
- Ichinose K, Ozawa M, Itou K, Kunieda K & Ebizuka Y (2003) Cloning, sequencing and heterologous expression of the medermycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces* sp. AM-7161: towards comparative analysis of the benzoisochromanequinone gene clusters. *Microbiology.* 149: 1633-1645.
- Ikeda H & Omura S (1997). Avermectin biosynthesis. *Chem. Rev.* 97: 2591-2609.
- Kahan JS, Kahan FM, Geogelman R, Currie SA, Jackson M, Stapley EO, Miller TW, Hendlin D, Mochales S., Hernandez S, Woodruff HB & Birnbaum J (1979) Thienamycin, a new β -lactam antibiotic: Discovery, taxonomy, isolation, and physical properties. *J. Antibiot.* 32: 1-12.
- Kao CM, Katz L & Khosla C (1994) Engineered biosynthesis of a complete macrolactone in a heterologous host. *Science.* 265: 509-512.
- Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H & Imanaka H (1987) FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. 1: Fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. *J. Antibiot.* 40: 1249-1255.
- Lancini GC, Parenti F & Gallo GG (1995) Antibiotics: A Multidisciplinary Approach. Plenum Press New York, NY.
- Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G & Marinelli F (2000) Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 78: 399-405.
- Liu J, Farmer J, Lane W, Friedman J, Weissman I & Schreiber S. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK-506 complexes. *Cell* 66: 807-815.
- Pritchard D (2005) Sourcing a chemical succession for cyclosporin from parasites and human pathogens. *Drug Discov Today* 10: 688-691.
- Sobell H (1985) Actinomycin and DNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5328-5331.i
- Stauton J & Weissman KJ (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep.* 18: 380-416.

- Strohl WR, Bartel PL, Li Y, Connor NC & Woodman RH (1991) Expression of polyketide biosynthesis and regulatory genes in heterologous streptomycetes. *J. Ind. Microbiol.* 7: 163-174.
- Stutzman-Engwall KJ, McArthur H & Katoh Y (2001) Streptomyces avermitilis gene directing the ratio of B2:B1 avermectins. USA Patent 6,511,841B2.
- Tomasz M (1995) Mitomycin C: Small, fast and deadly (but very selective). *Curr. Biol.* 2: 575-579.
- Vežina C, Kudelski A & N. Sehgal S (1975) Rapamycin (AY 22,989), a new antifungal antibiotic. 1: Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot.* 28: 721-726.
- Westley JW (1977) Polyether antibiotics: Versatile carboxylic acid ionophores produced by Streptomyces. *Adv. Appl. Microbiol.* 22: 177-223.
- Yung P (1997) The microbial world: Foundation of the world. *ASM News.* 63: 417-421.
- Zhang Y, Muyrers J, Testa G & Stewart A (2000) Functional expression of genes involved in the biosynthesis of the novel polyketide chain extension unit, methoxymalonyl-acyl carrier protein, and engineered biosynthesis of 2-desmethyl-2-methoxy-6-deoxyerythronolide B. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 5268-5269.
- Ziehl M, He J, Dahse HM & Hertweck C (2005) Mutasynthesis of aureonitrile: an aureothin derivative with significantly improved cytostatic effect. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44: 1202-1205.

El Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM invita a los interesados a ocupar una plaza de Investigador Titular Jefe de grupo, para trabajar en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología con especialidad en Biotecnología de fermentaciones, Biotecnología enzimática, Biotecnología ambiental y Biotecnología médica o áreas relacionadas.

Bases:

1. El candidato deberá tener el título de Doctor y experiencia posdoctoral.
2. Haber trabajado al menos cuatro años en labores docentes o de investigación y haber publicado como mínimo 10 artículos originales de investigación en revistas internacionales indizadas, que demuestren el dominio de una línea de investigación mediante el establecimiento de una producción científica constante y coherente. Los elementos a considerar incluyen, entre otros, el grado de participación en la obra publicada, la obtención de recursos para su ejecución y liderazgo en el proyecto.
3. Haber demostrado capacidad para formar personal especializado en su disciplina a través de la docencia frente a grupo, dirección de tesis, tutorías y/o estancias de investigación de alumnos bajo su supervisión directa.

La posición y el salario dependerán de las calificaciones del candidato.

Para participar en este concurso los interesados deberán enviar su currículum vitae, un proyecto de investigación en el área, tres referencias personales, así como un título tentativo para la impartición de un seminario institucional a la Secretaría Académica del Instituto de Investigaciones Biomédicas (mefc@servidor.unam.mx), a más tardar el día 5 de Octubre del presente año.

Cd. Universitaria D.F. a 1º de Agosto de 2007.

La Directora

Doctora Gloria Soberon Chávez

REVISTA de la Sociedad Mexicana de

BIO TECNOLOGIA

y Bioingeniería, A.C.



Nueva Era.
Volúmen 11, Número 3
Año 2007

Indice

Editorial	3
Instrucciones para los autores	4

Artículos

La enfermedad de Alzheimer, Estrategias terapéuticas	8
Producción biológica de hidrógeno por vía fermentativa: fundamentos y perspectivas	19
Los cultivos mixtos y las fermentaciones alcohólicas	28
Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por Actinomicetos	37