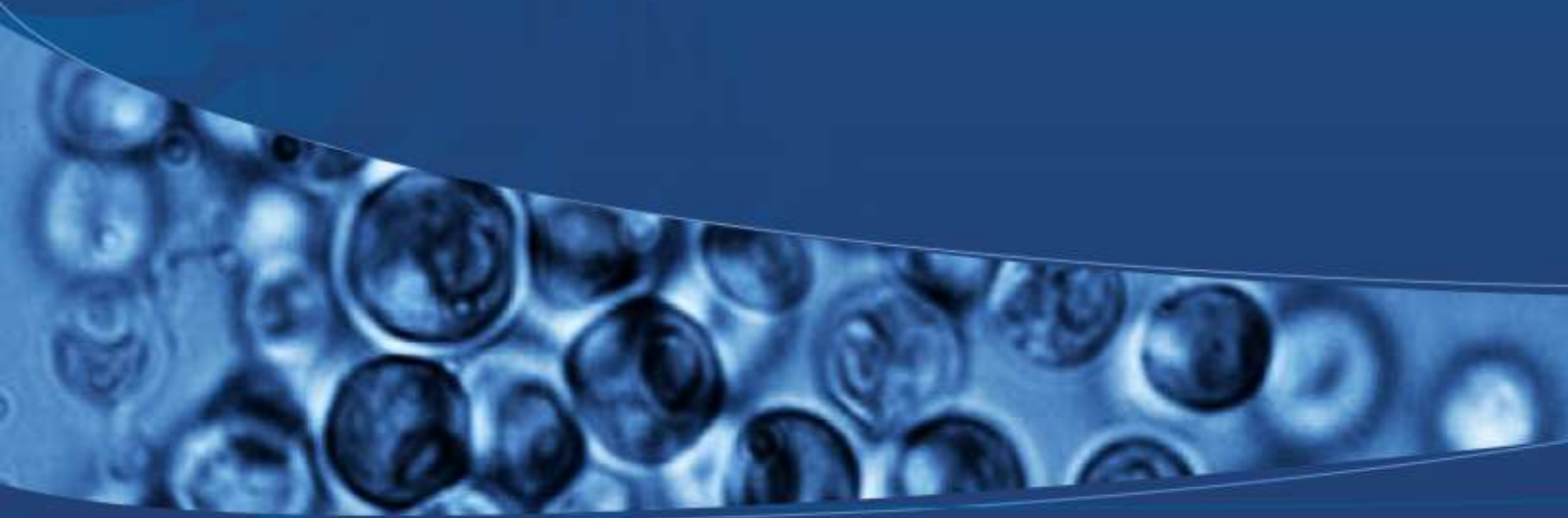


Revista de la Sociedad Mexicana de
Biotechnología
y Bioingeniería A.C.



Año 2016 Volumen 20 Número 3
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotechnología y Bioingeniería

MESA DIRECTIVA

Dr. Carlos Regalado González
Presidente

Dr. Adelfo Escalante Lozada
Vice-Presidente

Dr. Nicolás Oscar Soto Cruz
Secretario

Dra. María Teresa Torres Mancera
Tesorero

Dra. Sylvie Leborgne
Subsecretario

Dr. Aldo Amaro Reyes
Vocal Profesional

Ing. Diana Victoria Melo Sabogal
Vocal Estudiante

TRABAJO DE EDICIÓN

M. C. Olga Berenice Álvarez Pérez

COMITÉ EDITORIAL

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

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
CINVESTAV

Dr. Fernando Luis García Carreño
CIBNOR

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
UAM-Iztapalapa

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
UNAM

Dra. Sara Solís Pereira
Instituto Tecnológico de Mérida

Dra. Elizabeth Langley McCarron
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Víctor Manuel Loyola
Centro de Investigación Científica de
Yucatán

DISEÑO GRAFICO E IMAGEN

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

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM). Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1999-082516265000-101. Los Conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Del. Tlalpan, México, D.F. o a la siguiente dirección electrónica smbb1982@gmail.com

EDITORIAL

Una Reflexión Sobre el Uso del Factor de Impacto de las Publicaciones Científicas como Criterio para la Evaluación de la Productividad del Personal Académico Adscrito a Instituciones de Educación Superior

Imelda López Villaseñor y Sergio Sánchez Esquivel **4**

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES **7**

ARTÍCULOS

Clarificación de una Bebida Alcohólica a Base de Merey (*Anacardium occidentale L.*) a Partir de un Concentrado Enzimático

Carlos Alvarado Almarza, Celeste Fernández González, Alexandra Jiménez Lucena y Johana Paucar Baque **12**

¿Cómo abordar el estudio de una proteína hipotética? el caso de la proteína SCO2127 de *Streptomyces coelicolor*

Víctor Tierrafría y Sergio Sánchez **27**

Una Reflexión Sobre el Uso del Factor de Impacto de las Publicaciones Científicas como Criterio para la Evaluación de la Productividad del Personal Académico Adscrito a Instituciones de Educación Superior

La actividad científica requiere ser evaluada. Para quienes nos dedicamos a esta actividad, el resultado de nuestra evaluación repercute en diversos aspectos como son contrataciones, promociones, asignación de recursos, etc. Existen diversos parámetros que se utilizan en la evaluación de un científico, pero una de las métricas que se ha utilizado con mayor frecuencia es el Factor de Impacto (FI) de las revistas en las que publicamos los resultados de nuestro trabajo académico.

El FI se introdujo en 1963 como un indicador para apoyar a los bibliotecarios en la toma de decisiones sobre las revistas impresas que las Universidades debían adquirir. Este número indica el promedio de las citas que recibieron todos los artículos publicados durante un cierto período de tiempo en una determinada revista; no se propuso como un mecanismo de evaluación individual, sino como una medida del impacto (e indirectamente de la calidad) de una revista. En los últimos años se ha expresado una gran preocupación a nivel mundial por la sobrevaloración del FI y el mal uso que se le ha dado a este factor en los procesos de evaluación individual.

El FI es un factor emitido anualmente por la empresa Thomson Reuters, y representa el número promedio de citas que recibieron los artículos de una revista a lo largo de un período de tiempo

Como resultado de lo anterior, en diciembre de 2012 un grupo formado por editores de las principales revistas científicas y de organizaciones académicas redactaron un documento con una serie de recomendaciones conocido como: **San Francisco Declaration on Research Assessment (DORA)**. Este documento es un reflejo de la preocupación por los métodos de evaluación que se aplican hoy en día, y de la necesidad de mejorarlos y actualizarlos. En él se emite una recomendación general y 17 recomendaciones específicas dirigidas a los institutos de investigación, a los investigadores, a las editoriales, a las agencias que generan los indicadores, y a las instituciones que otorgan recursos económicos para realizar investigación. El documento original fue firmado por más de 150 científicos destacados y respaldado por 75 organizaciones científicas. Vale la pena citar textualmente la recomendación general:

General Recommendation:

Do not use journal-based metrics, such as Journal Impact Factors, as surrogate measures of the quality of individual research articles, to assess an individual scientist's contributions, or in hiring, promotion, or funding decisions.

Esta iniciativa fue asumida por la American Society for Microbiology con el fin de eliminar la difusión del valor del FI de 14 publicaciones de alto nivel que son auspiciadas por la misma (*Journal of Microbiology, Clinical and Vaccine Immunology, Applied and Environmental Microbiology, Molecular and Cellular Biology*, entre otras), por lo que a partir del 17 de Julio de 2016 en las páginas electrónicas de estas revistas no aparece el FI asignado por Thomas Reuters. Al pie de ésta página, se incluyen las referencias bibliográficas sobre algunos editoriales en torno a este tema, que han aparecido en *Science, Nature, PNAS* y *EMBO J*¹.

De éste modo, se ha enfatizado a nivel mundial la importancia de dejar a un lado el FI de una revista como la medida directa para evaluar la calidad del trabajo de investigación individual. Se ha mencionado que un parámetro fundamental que debería considerarse es la evaluación por pares, además de tomar en cuenta otros aspectos relacionados con la investigación como es el impacto en la sociedad en que se realiza. Se ha señalado también la importancia que tienen los medios de difusión electrónicos actuales para ofrecer de manera inmediata e irrestricta la información a nivel mundial a través de los recursos de acceso abierto a la información (Open Access). Por otra parte, son bien conocidos los nuevos parámetros que utilizan algunas revistas académicas (que se revisan y actualizan de manera casi inmediata) como son *Article metrics, online attention (Tweets, Facebook pages, mentions in google+, posts, picked up by x, news outlets, blogged)*, etc., que muestran en tiempo real la difusión que tiene una publicación.

Lo anterior refleja los cambios tan importantes que se han dado de 1963 a la fecha. ¿Será éste el momento para reflexionar sobre los parámetros que se utilizan en los procesos de evaluación de los resultados del trabajo académico? ¿Será éste el momento para dejar de utilizar el FI como el único parámetro principal en la validación de dicho trabajo? Quizá es tiempo de mirar hacia afuera, escuchar otras voces y otras propuestas, reflexionar y permitirnos modificar y actualizar lo que consideremos que se debe adecuar.

Se reconoce que no será una tarea fácil, todo lo contrario, es un gran reto. Pero estamos seguros que como Instituciones de Educación Superior en el país, tenemos la fortaleza y los elementos para abordar este proceso de reflexión. Consideramos que diversas instituciones debieran tomar la batuta y proponer a la brevedad variantes a la forma de valoración tradicional de nuestras publicaciones.

Bajo el marco anterior, se propone que:

¹ Impact, not impact factor. Inder M. Verma. Editor-in-Chief, PNAS. 2015. vol 112, 7875-7876.

Impact Factor Distortions. Bruce Alberts. Editor-in-Chief, Science. 2013. Vol 340, 787.

Dora the Brave. Brend Pulverer. Chief Editor, The EMBO Journal. 2015. DOI 10.15252/emj.201570010

The Leiden Manifesto for research metrics. Diana Hicks et al. Nature 2015. vol 520, 429-31.

-En la evaluación de los trabajos de investigación se pondere la calidad de las publicaciones y no solo la cantidad de las mismas, independientemente de la orientación del trabajo publicado (básico o aplicado).

-Que se tome en cuenta el grado de participación del investigador, la originalidad y la calidad de la contribución.

-Que los trabajos a considerar, hayan sido evaluados por pares y publicados en revistas de difusión nacional e internacional, incluidas en cualquiera de los índices que corresponden a las diferentes áreas (**CAS -American Chemical Society, Index Copernicus International, Science Central, iSeek, Jour-informatics, Journal seeker, indice de revistas mexicanas del CONACYT**) y no solo en **Thompson Routers**.

-Que en los procesos de evaluación se acepten aquellos trabajos que sean publicados en revistas de acceso libre, siempre y cuando sean arbitradas y cuenten con un comité editorial de reconocido prestigio.

-Que también se tomen en cuenta como productos primarios de investigación las revisiones y capítulos de libro que sean evaluados por pares, ya que estos representan un claro esfuerzo para presentar la visión del estado del arte de un tema en particular.

-Que se consideren también como productos primarios de investigación las patentes nacionales e internacionales, publicaciones que son el resultado del esfuerzo encaminado a transferir a la sociedad los productos o conocimientos generados.

Es necesario recalcar que estas propuestas se refieren solamente a la publicación del trabajo de investigación y que **de ninguna forma sustituyen los compromisos y obligaciones del personal académico en la docencia y formación de recursos humanos**, propios de una Institución de Educación Superior.

Dra. Imelda López Villaseñor y Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Investigadores Titulares

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Ciudad de México

E-mails: imelda@biomedicas.unam.mx; sersan@biomedicas.unam.mx

Instrucciones para los autores

Guía de Autores

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

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

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

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

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

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

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

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

1. ¿Qué es y para qué sirve la Biotecnología?. Es decir: descripciones que ilustren y divulguen los distintos campos de la biotecnología, sus alcances y limitaciones, su historia y sus perspectivas.
2. Las fronteras de la biotecnología: revisiones de nuevos campos o nuevas aplicaciones de la biotecnología. Por ejemplo: las perspectivas del uso de los genomas para el desarrollo de nuevas drogas o para el tratamiento de enfermedades metabólicas. Las perspectivas de la genómica (estudio sistemático de los genes y sus aplicaciones), la proteómica (predicción de la expresión de los genes en proteínas funcionales) y la fenómica (predicción de fenotipos o

Instrucciones para los autores

conductas de los organismos, en base a sus genes y a sus proteínas). El uso de la ingeniería genética para hacer ingeniería metabólica. Los nuevos tipos de reactores biológicos y los fenómenos de transporte implicados. Los nuevos esquemas de reacción, separación y control en procesos biotecnológicos.

3. Aplicaciones de la Biotecnología para resolver problemas o atender necesidades de la sociedad, con especial atención a sus aplicaciones ya vigentes en México. Esta sección será dedicada a una empresa o institución (pública o privada) que desee difundir los logros obtenidos en algún campo de la biotecnología. Por ejemplo: empresas productoras de antibióticos o productos biológicos, empresas de ingeniería ambiental que usen procesos biotecnológicos, empresas agropecuarias, forestales o de acuicultura que usen tecnologías biológicas avanzadas, o empresas de transformación de alimentos que utilicen enzimas, cultivos de microorganismos, etc. Esta lista es indicativa pero no exhaustiva.
4. Problemas de bioseguridad, bioética y biodiversidad relacionados con las aplicaciones de la biotecnología a la sociedad. Por ejemplo: análisis y comentarios sobre los debates acerca del uso de semillas transgénicas, los problemas de conservación y explotación de la biodiversidad mediante la biotecnología, los riesgos del uso de organismos transgénicos en diversos campos de la industria, los problemas de bioseguridad del uso de antibióticos y otros productos biotecnológicos.
5. La educación, la cultura y la difusión tecnológica en relación con la biotecnología. Por ejemplo: comentarios de planes y programas, de estilos y necesidades de la enseñanza, del enfoque interdisciplinario, en carreras o planes de estudio directamente ligados con la biotecnología. También necesidades y modalidades sobre programas de extensión educativa para la industria, para el público consumidor o para grupos selectos de personas interesadas en la biotecnología (políticos, funcionarios de empresas, líderes de opinión). El uso de la informática en la difusión de la biotecnología, y en general, el análisis de necesidades, métodos y alternativas para difundir los conocimientos de la biotecnología.
6. Oportunidades y propuestas para mejorar la cooperación y el desarrollo biotecnológicos. Por ejemplo: Análisis de las oportunidades vigentes de intercambio académico o comercial en biotecnología. Propuestas de nuevas formas de cooperación entre los sectores de investigación y la industria biotecnológica. Análisis y propuestas del uso óptimo de recursos humanos, financieros o materiales para mejorar la cooperación o el desarrollo de la biotecnología. En esta sección se dará espacio a los análisis, críticas o propuestas de los aspectos legales y fiscales que afecten e incluso puedan mejorar el desarrollo de la biotecnología en México. Tales como: la propiedad industrial, el régimen fiscal de las empresas, el costo del desarrollo biotecnológico y los subsidios o estímulos económicos para el desarrollo de la biotecnología.

Instrucciones para los autores

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

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

2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño **12**. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra *itálica* Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como el e-mail del autor corresponsal.

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

4. Se incluirán entre 3 a 6 **Palabras clave:** que permitan clasificar el artículo en una base de datos.

Estas palabras deberán de incluirse en Español y en Inglés (**Key words:**).

5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste se pondrá como primera línea en *cursivas* con letra Arial o equivalente tamaño **10**. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño **10**. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras *itálicas*.

6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras. La impresión de las figuras e imágenes se hará en blanco y negro, por lo que se recomienda que muestren un buen contraste, en especial las figuras con varias líneas. Según el orden de aparición en el texto, las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto pero se anexarán en hojas separadas después de las **Referencias**.

7. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a tal fuente de información original, si ello fuera necesario. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: "Martínez &

Instrucciones para los autores

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:

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

Para libros y capítulos de libros:

(Libro)

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

(Capítulo de libro)

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

Para patentes:

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

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

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solís S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del Complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de *Aspergillus HL*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

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

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

Revistas electrónicas:

Instrucciones para los autores

Sun J, Lu X, Rinas U, & Zeng AP (2007) Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. *Genome Biol.* 8: R182. *BioTecnología*, Año 2015, Vol. 19 No. 1 11

Para tesis de pre y posgrado:

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

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

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos. Los trabajos solamente se reciben vía correo electrónico al Comité Editorial encabezado por el Dr. Sergio Sánchez Esquivel en la dirección sersan@biomedicas.unam.mx. Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor corresponsal, por lo que se pide Incluir una dirección de correo electrónico para este fin, así como para mantener comunicación con el editor sobre la evolución de la revisión y sobre la aceptación del mismo.

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

Clarificación de una Bebida Alcohólica a Base de Merey (*Anacardium occidentale L.*) a Partir de un Concentrado Enzimático

Carlos Alvarado Almarza, Celeste Fernández González, Alexandra Jiménez Lucena y Johana Paucar Baque

*Laboratorio de Biotecnología Industrial (LABIOT). Centro de Investigaciones Químicas (CIQ).
Facultad de Ingeniería. Universidad de Carabobo. Valencia. Estado Carabobo. Venezuela
E-mail: c_alvarado_almarza@yahoo.es ; calvarado@uc.edu.ve*

RESUMEN

La presente investigación consistió en la clarificación de una bebida alcohólica a base de Merey (*Anacardium occidentale L.*), mediante la adición de concentrados de enzimas pectinolíticas, uno extraído de guayaba y otro de Papaya. La bebida alcohólica se preparó según las normas COVENIN y Codex Stand 247 (2005), a base de Merey amarillo mediante fermentación durante 96 h con *Saccharomyces cerevisiae*. Se emplearon 3 kg del pseudofruto del Merey para obtener 800 ml de vino. La efectividad del concentrado enzimático se evaluó con un diseño factorial mixto 2x4x4, se midió la absorbancia en el vino antes y después de la adición del concentrado, y se observó disminución en la intensidad del color. Luego, se aplicó una encuesta valorativa sumatoria y se obtuvo para el brillo y limpidez una preferencia de 64% en el vino clarificado. Se formuló la bebida alcohólica clarificada y se realizó una evaluación sensorial hedónica.

Palabras Clave: Clarificación, enzimas pectinolíticas, Merey, Papaya, concentrado enzimático.

ABSTRACT

This research consisted of clarification of an alcoholic beverage made from cashew (*Anacardium occidentale L.*) using an pectic enzyme concentrates; first of them extracted from guava and papaya another. The beverage was prepared according to Codex Stand 247 (2005) and COVENIN standards-based yellow cashew by fermentation for 96 h using *Saccharomyces cerevisiae*. A three (3) kg of pseudofruit were used to obtain 800 ml of wine. The effectiveness of the enzyme concentrate was evaluated using a mixed factorial experimental design 2x4x4, and the absorbance was measured in the wine before and after addition of concentrated, and observed decrease in color intensity. Then a summation valuation survey was applied and obtained for the brightness and clarity of a preference 64% for wine clarified. Alcoholic beverage clarified was formulated and a hedonic sensory evaluation was conducted.

Keywords: Clarification, pectic enzymes, cashew, papaya, concentrated enzyme.

INTRODUCCIÓN

Las bebidas alcohólicas tienen su origen en la fermentación alcohólica. Este, es un proceso anaeróbico que genera etanol y desprende grandes cantidades de dióxido de carbono, debido a la acción de las levaduras que, en ausencia de aire, oxidan la glucosa y otros azúcares (Ezeronye, 2004).

La clarificación de los vinos es una práctica muy antigua realizada en Enología. Los fines que se persiguen con la clarificación son, en un principio, acelerar la eliminación de materias que enturbian la bebida alcohólica por un procedimiento más rápido que el de sedimentación y trasiego. Existen diversos clarificantes proteicos y/o enzimáticos de origen vegetal y animal (Acosta, 2014). Los clarificantes enzimáticos a base de enzimas pectinolíticas han tomado gran importancia por su rápido efecto. Las enzimas pectinolíticas corresponden a una mezcla de dos o más tipos de enzimas que en combinación hidrolizan a las pectinas.

Las pectinas son heteropolímeros conformados por tres tipos de estructuras que pueden variar en sus proporciones: homogalacturonanos, ramnogalacturonanos I y ramnogalacturonanos II, el primero conformado por residuos de galactopiranosilurónico unidos por enlaces (1→4) en donde algunos grupos carboxilos se encuentran metil esterificados y dependiendo de la especie vegetal pueden estar O-acetilados en los carbonos 2 y 3 (Thakur *et al.*, 1997; Ridley *et al.*, 2001; Willats *et al.*, 2006). Los ramnogalacturonanos I están constituidos por una cadena principal de dos

disacáridos repetidos [→4) – ácido α -D-galactopiranosilurónico (1→2)- α -L-ramnopiranosil (1→] con aproximadamente 20 a 80% de las moléculas de la ramnosa unidas por enlaces (1→4) a cadenas de oligosacáridos ácidos y neutros, formados principalmente por arabanos, galactanos o arabinogalactanos y en menos escala por ácido D-glucurónico. Y los ramnogalacturonanos II representan un grupo de polisacáridos con cadenas laterales complejas unidas a la cadena principal de α -D-galactopiranosilurónico (Ridley *et al.*, 2001).

Las enzimas pectinolíticas están conformadas por tres tipos: pectinesterasas, poligalacturonasas y pectinliasas. Las pectinesterasas hidrolizan los grupos carboxilo esterificados del carbono 6 de las moléculas de α -D-galactopiranosilurónico y liberan metanol, las poligalacturonasas hidrolizan los enlaces glicosídicos de la cadena principal de las pectinas α -D-galactopiranosilurónico restos de α -D-galactopiranosilurónico, y las pectinliasas hidrolizan de forma desproporcionada los enlaces glicosídicos de la cadena principal generando dos tipos de restos de α -D-galactopiranosilurónico, una saturada con extremo terminal –OH y otra insaturada (Nagodawhitana & Reed, 1993). Las enzimaspectinolíticas son aplicadas al mosto antes de la fermentación para coagular coloides con el propósito de obtener un vino clarificado (Nagodawhitana & Reed, 1993; Whitaker, 1994).

La fase visual es una etapa de gran importancia en la calidad de los productos alimenticios y las bebidas alcohólicas no son ajenas a esta situación, ya que propiedades

sensoriales como el brillo, transparencia, entre otros, se ven afectadas por las partículas en suspensión propias del procesamiento del mosto, y por tanto es necesario el uso de clarificantes para disminuir el efecto de las mismas. Otro aspecto importante a estudiar es la turbidez del vino, igualmente es significativo el color o la cromaticidad de la bebida alcohólica y en el caso de los vinos blancos son esencialmente relevantes las reacciones de pardeamiento ya que son las que condicionan el color que varía desde amarillo pálido hasta tonos marrones.

En la presente investigación, se preparó una bebida alcohólica a base de Mery (*Anacardium occidentale L.*), mediante fermentación sumergida con la levadura *S. cerevisiae*, ya que en estudios previos demostró ser la idónea para consumir todos los azúcares fermentables, y por tanto asegurar el proceso. El clarificante utilizado se preparó a base de enzimas pectinolíticas de frutas de procedencia nacional: guayaba y papaya, empleando un diseño factorial mixto 2x4x4 y finalmente se realizó la evaluación sensorial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del concentrado enzimático

La guayaba y la papaya fueron compradas en un mercado local, se lavaron, pelaron y retiraron las semillas. Se procesaron dos porciones por separado de cada pulpa de 30 g y luego se conservaron a 4 °C (Flores, 2004). Luego se colocaron en un embudo con doble capa de papel de filtro; se realizaron 4 lavados con 5 mL de acetona a -20 °C con el fin de

eliminar los fenoles (Espinal, 2010; Torres *et al.*, 2006).

Posteriormente, se procedió a la extracción del concentrado enzimático, mediante la agitación de la muestra resultante de la etapa anterior, con la adición controlada de 30 mL de solución extractora de (NaCl) 1.5 M. Luego se reajustó el pH a 7.8 con hidróxido de sodio (NaOH) 1.5 M.

La mezcla se centrifugó a 7000 rpm (5911.2 xg) durante 45 min. El sobrenadante obtenido se filtró con papel Whatman N°5 prepesado y se separó en dos partes iguales, una se dejó intacta y la segunda se precipitó con sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄], un 30% de saturación; en seguida se centrifugó a 7000 rpm (5911.2 xg) durante 45 min. Se transvasó el sobrenadante y se recuperó el extracto enzimático parcialmente purificado (Flores, 2004; Mondal *et al.*, 2009; Ashurst, 2005).

Las cantidades empleadas de sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄] para la extracción del concentrado enzimático se indican en la Tabla 1, donde además se reflejan las cantidades de materia prima necesarias para la preparación del concentrado enzimático de guayaba y papaya respectivamente.

Tabla 1. Formulación de los concentrados

Fuente	Cantidad (g)	Acetona (ml)	Sulfato de Amonio (g)	Cantidad de concentrado (ml)
Guayaba	30	20	4.1	18.5
Papaya	30	20	4.5	20

Preparación de la bebida alcohólica a base de merey

Para obtener un (1) litro de mosto se trataron (3) tres kilogramos de fruto a los cuales se les removió la nuez, y el pseudofruto recolectado se colocó en remojo con agua potable para eliminar la suciedad que pudieran tener debido al proceso de recolección. Posteriormente se realizó una inmersión del pseudofruto ya limpio en solución salina al 1% para reducir su astringencia y se esterilizaron en autoclave a 1.5 psig y 121°C durante 15 min (Mohanty *et al.*, 2006).

Luego, el pseudofruto ya esterilizado se procesó en un extractor de jugo y el bagazo obtenido se filtró y prensó a fin de obtener la mayor cantidad posible. Se ajustaron los sólidos solubles con azúcar comercial a 30°Brix y el pH se ajustó a 4 con ácido cítrico al 10%. El mosto se esterilizó a 1.5 psi durante 15 min y se agregaron 0.2 g/l de metabisulfito de sodio, 1 g/l de sulfato de amonio y 1 g/l de fosfato de potasio (Torres *et al.* 2006).

Para preparar el inóculo se inocularon 10 g de levadura fresca comercial *Levapan* en 50 ml de caldo nutritivo en un matraz de 100 ml. Se incubó a temperatura ambiente (28 °C) a 150 rpm durante 24 h. Posteriormente se tomaron 15 ml del cultivo iniciador de levadura y se diluyeron hasta 50 ml con solución isotónica al 0.85% p/v (Araujo *et al.*, 2011).

El proceso de fermentación se realizó en matraces de 250 ml conteniendo 50 ml del mosto y 5% del inóculo en incubación orbital a 150 rpm (2.7 xg) durante 96 h (4 días). Una vez

cumplido el tiempo de fermentación estipulado se eliminó la levadura por separación sólido-líquido facilitada por su deposición mediante refrigeración a 4 °C durante 24 h, y posterior centrifugación a 6000 rpm (4342.9 xg) durante 30 min y finalmente filtraron. La pasteurización se realizó en un autoclave a 100°C por 10 min y luego se enfrió a 4°C durante 30 min (Araujo *et al.*, 2011).

Determinación de taninos en el pseudofruto

Se determinó la cantidad de taninos siguiendo la metodología expuesta por Mohanty *et al.* (2005) en la cual se colocaron 10 g del pseudofruto en 100 ml de etanol al 96% durante un aproximado de 16 h, luego se añadió sulfato de sodio anhidro y se filtró. Este filtrado se secó hasta peso constante en estufa a 105 °C. La cantidad de taninos fue expresada en mg por cada 100 ml de solución salina al 1%.

Evaluación de los concentrados enzimáticos en el proceso de clarificación de la bebida

Se realizó un diseño experimental factorial mixto 2x4x4 por triplicado para un total de 96 experimentos para evaluar el concentrado enzimático de guayaba y papaya. Se tomaron las muestras obtenidas de la fermentación y se les agregó el concentrado enzimático de guayaba y papaya variando sus cantidades y el tiempo de actuación (Tabla 2). Las muestras resultantes de cada interacción se colocaron en vasos de precipitado de 100 ml y se agitaron durante un tiempo de 10 min.

Artículos

Tabla 2. Diseño experimental para evaluar los concentrados enzimáticos en la clarificación de la bebida alcohólica de Merrey

Factor	Nivel		Variable de respuesta
	Variable normal	Variable codificada	
Variedad	Papaya	(-1)	Absorbancia (adim)
	Guayaba	(+1)	
Volumen de clarificante	0 mL	(-1)	
	5 mL	(-0.33)	
	15 mL	(+0.33)	
	25 mL	(+1)	
Tiempo	0 h	(-1)	
	24 h	(-0.33)	
	48 h	(+0.33)	
	72 h	(+1)	

Se caracterizó la bebida alcohólica con el clarificante mediante la determinación del grado alcohólico (COVENIN 3042-93), sólidos solubles (COVENIN 924-83), pH (COVENIN 1315-79), acidez titulable (COVENIN 3286-97 y COVENIN 1151) y densidad, además de la medición de la absorbancia empleando un espectrofotómetro UV con una longitud de onda de 420 nm.

Selección del concentrado enzimático más adecuado para clarificar la bebida alcohólica a base de Merrey

Se revisaron diversas normas COVENIN 3340-3342 y el CODEX ALIMENTARIUS (CODEX STAN 247, 2005) para la elaboración de vinos, las cuales establecen las

características esenciales que deben tener los componentes de una bebida alcohólica a base de frutas, así como las particularidades de dicho producto.

La norma general del CODEX para zumos (jugos) y néctares de fruta (Codex Stan 247, 2005) indica que el nivel de °Brix requerido para el mosto debe encontrarse en un rango entre 12 y 40. Como proceso de selección, además de la caracterización y el estudio de la absorbancia, se realizó una encuesta a escala valorativa sumatoria preliminar a 20 personas, para elegir el de mayor preferencia por el panel encuestado.

Determinación de actividad enzimática

La medición de actividad enzimática de la pectin-esterasa se realizó mediante la técnica del pH estático reportada por Argai & López-Malo (1996). Se tomó una alícuota de concentrado enzimático igual a $(10,00 \pm 0.05)$ mL y se mezclaron con una solución de pectina cítrica al 1% en NaCl 1 M ajustando el pH a 7.8 tras la adición de cada gota de pectina; utilizando para esto una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2.07 M. Seguidamente se midió el pH y se tituló cada muestra con solución de NaOH 0.0004 N. Los resultados se expresaron en unidades de pectin-esterasa (UPE) por ml.

La unidad de pectin-esterasa (UPE) fue definida como el número de mili equivalentes de éster hidrolizados por minuto y mililitro de muestra, a pH 7.8 y se expresó en UPE/ mL (Flores, 2004).

$$\frac{UPE}{mL} = \frac{v * N}{t * a} * 10^6 \quad (1)$$

Donde:

v: volumen gastado de NaOH empleado para titular (ml)

N: normalidad de NaOH (eq/l)

t: tiempo de agitación (min)

a: alícuota (ml)

Evaluación sensorial de las características del producto obtenido después del proceso de clarificación

Para el análisis de las propiedades sensoriales finales se procedió a realizar una evaluación a escala valorativa sumatoria para una población de 50 individuos, en edades comprendidas entre 18 a 70 años, con el

objetivo de clasificar de forma discriminatoria y descriptiva la bebida alcohólica clarificada a base de merey (*Anacardium occidentale L.*) (Desrosier, 1977).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación del concentrado enzimático

La eliminación fenólica se lleva a cabo dado que puede inducir la inactivación de las enzimas, entre ellas la enzima de interés, pectinasas; al formarse polifenolxidasas y/o entrar en contacto las mismas ya presentes en tejidos con las enzimas generando una oxidación o pardeamiento que caracteriza la inhibición de la actividad enzimática (Nagodawhitana & Reed, 1993; Mondal *et al.*, 2009). Una vez obtenida la muestra de fruta sin fenoles se adicionó cloruro de sodio (NaCl) 1.5 M a fin de solubilizar las proteínas, es decir, las enzimas y luego la muestra fue centrifugada con la finalidad de separar totalmente la pulpa de las fase acuosa.

Preparación de la bebida alcohólica a base de Merey

El Merey se presenta en dos especies: una roja y otra amarilla. En esta investigación se empleó Merey amarillo. Se realizó la caracterización fisicoquímica, en donde los resultados obtenidos a la 5ta semana indican que la especie amarilla alcanzó mayor grado de madurez. Su relación sólidos solubles azúcares/acidez es más alta lo que brinda

condiciones óptimas para la fermentación (Tabla 3).

Tabla 3. Tiempo de maduración del Merey

Variedad	Grado de madurez (Adim)
Merey rojo	10.75
Merey amarillo	16.90

Luego del tratamiento inicial de la fruta según Mohanty *et al.* (2006), se realizó la inmersión de la misma en solución salina al 1%, esto con la finalidad de reducir la cantidad de taninos presentes en el Merey (Yahaya *et al.*, 2010). Después del tratamiento los taninos disminuyeron en un 61.76 %, pasando de 1020 a 630 mg/100 ml.

Los taninos representan la medida indirecta de la astringencia, que no es más que una sensación que corresponde al grado de pérdida de lubricación de la cavidad bucal, dando de esta forma, una sensación de aspereza y sequedad. Sin embargo, no se eliminan en su totalidad ya que estos presentan propiedades medicinales tales como: antidiarreicos, antioxidantes, antiinflamatorios y antisépticos (Mohanty *et al.*, 2006; Guerrero *et al.*, 2008). La cantidad de vino obtenida por cada 3 kg de merey amarillo fue de aproximadamente 800 ml.

Evaluación del concentrado enzimático en el proceso de clarificación de la bebida a partir de un diseño experimental a escala de laboratorio

La bebida alcohólica empleada para evaluar la clarificación con el concentrado enzimático se obtuvo a partir del Merey amarillo (*Anacardium occidentale L.*), porque es una fruta de producción nacional y además el concentrado enzimático de papaya y guayaba.

A través de un diseño experimental factorial utilizando como factores la concentración del clarificante y el tiempo de la clarificación se evalúa la efectividad del concentrado enzimático. El modelo empleado es la Metodología de Superficies de Respuesta (RSM) que no es más que un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo, según Gutiérrez & De la Vara (2008)

En la presente investigación después de la fermentación, la bebida alcohólica contiene partículas en suspensión, surgiendo la necesidad de clarificarlo mediante la adición de un producto clarificante capaz de coagularse con los elementos sólidos que lo enturbian y de producir grumos que sedimenten las partículas que producen la turbidez, arrastrándolas al fondo para clarificar el vino. Para evaluar el comportamiento del clarificante se aplicó dicha metodología de superficie de respuesta con un diseño experimental de 2^2 preparando muestra de vino de 50 ml variando la cantidad de concentrado enzimático y el tiempo de actuación del mismo, estudiando así la respuesta de absorbancia del vino.

Los valores obtenidos de absorbancia con el concentrado enzimático de papaya son menores a los del concentrado enzimático de

guayaba, tal como se indica en las Figuras 1 y 2. Estos resultados son congruentes para un espectro de absorción de un vino blanco según reporta Ribéreau-Gayon (2003).

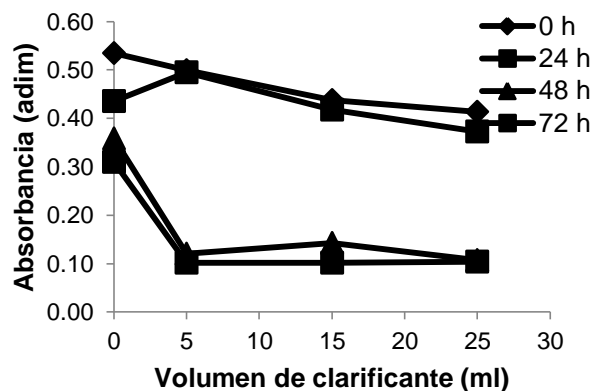


Fig. 1. Variación de la Absorbancia (a 420 nm) en función del tiempo del vino clarificado con concentrado enzimático de papaya

Esta diferencia entre ambos clarificantes se debe a que la actividad enzimática de la papaya (5.333 UPE/mL) es mayor a la de la guayaba (1.333 UPE/ml). Así mismo, a medida que aumenta el tiempo de incubación con respecto al aumento de la concentración enzimática, la absorbancia del vino clarificado disminuyó en todos los tratamientos (Figura 1). Esto se debe a la acción de la enzima al hidrolizar la pectina que puede llegar a suponer el 50% de la sustancia coloidal (González-San José *et al.*, 2013), además la hidrólisis facilita la precipitación de proteínas, polímeros fenólicos y en menor medida de ácidos urónicos, mejorando de esta manera el brillo y la luminosidad del producto final. Este efecto se incrementa con el tiempo de actuación para el caso de la papaya y se mantiene con el volumen de clarificante empleado.

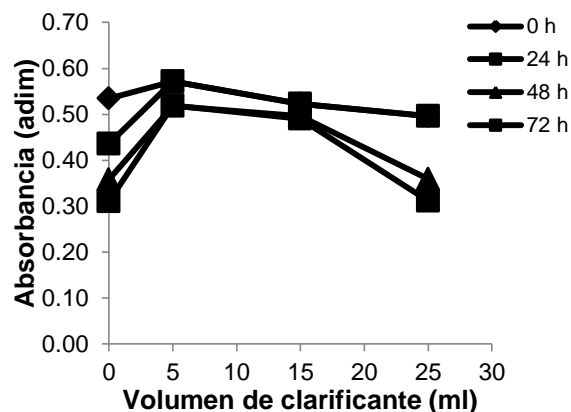


Fig. 2. Variación de la Absorbancia (a 420 nm) en función del tiempo del vino clarificado con concentrado enzimático de guayaba

En el caso de guayaba (Figura 2) se observó un aumento inicial de la absorbancia a volumen bajo de 5 ml y luego una disminución. Esto puede atribuirse a la baja concentración de enzimas pectinolíticas en la guayaba.

Lo anterior hace suponer que a menor

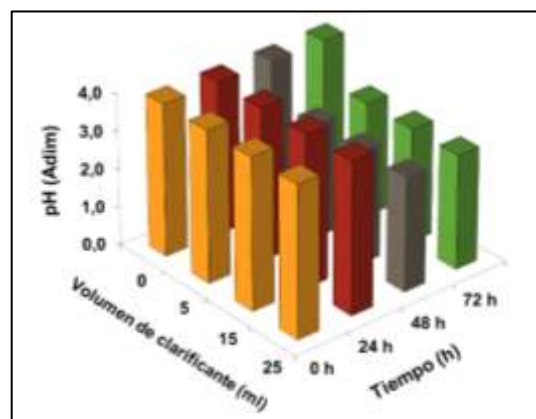


Fig. 3. Variación del pH en el tiempo del vino clarificado con concentrado enzimático de papaya

concentración de enzimas pectinolíticas se requiere mayor cantidad de concentrado, pero al mismo tiempo al emplear una baja cantidad del mismo se traduce en un aumento de la

absorbancia debido a que no se ha iniciado aún la hidrólisis enzimática de las pectinas.

A medida que aumenta el tiempo de incubación, el pH disminuye, y esta reducción está asociada a la labor catalizadora de la enzima sobre la pectina (Figura 3); esto se debe, a que la pectin-esterasa al hidrolizar los enlaces éster metílico (COOCH_3), libera metanol (CH_3OH) de los grupos carboxilos esterificados y transforma la pectina metoxilada en pectina de bajo metoxilo (Espinal, 2010). En la Figura 4,

igualmente se aprecia la variación de los sólidos solubles para diferentes tiempos de actuación del clarificante de papaya en la bebida alcohólica a base de merey. La disminución de los sólidos solubles es favorable, ya que representa la reducción de los sólidos suspendidos por acción de la enzima.

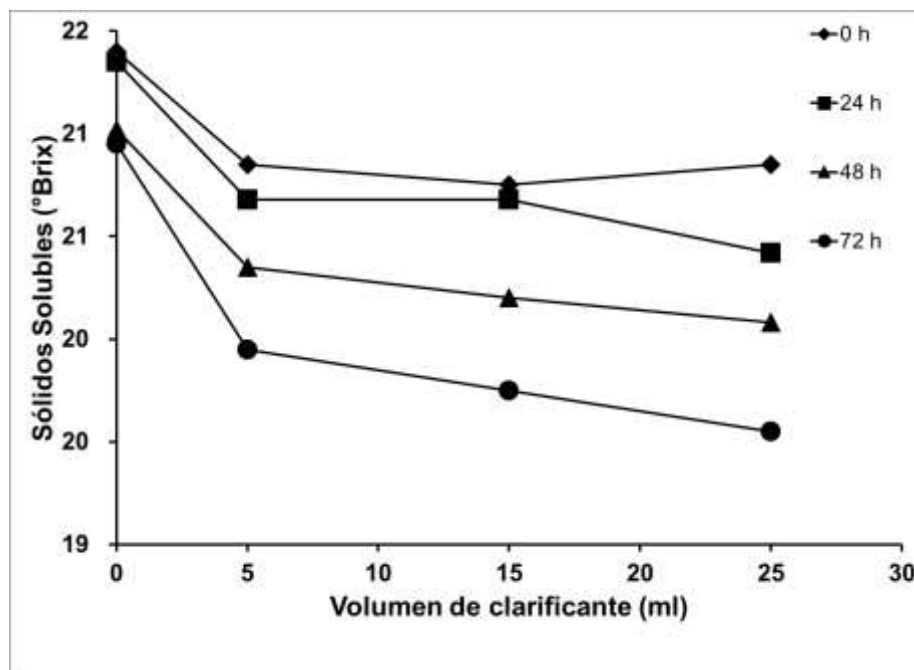


Fig. 4. Variación de los sólidos solubles en el tiempo para el vino clarificado con concentrado enzimático de papaya

En la Figura 5 se muestra el diagrama de Pareto para la variable respuesta: absorbancia, y los factores evaluados: tiempo, volumen de clarificante y variedad de fruta, como resultado de la validación estadística con un ajuste del 77.0865 % del modelo según el estadístico R-cuadrada ajustada, en la cual se observa que los tres factores tienen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre ellas más sus interacciones. De

igual manera se comprobaron los supuestos de normalidad de los datos, independencia y varianza constante para estadística paramétrica. Por otro lado, las superficies de respuesta, para las dos variedades papaya y guayaba se indican en las Figuras 6 y 7 se puede apreciar que a medida que aumenta el tiempo de incubación, la absorbancia disminuye con una tendencia a permanecer constante en el tiempo para las

Artículos

últimas horas de actuación, y a pesar de existir ligeros aumentos para volúmenes entre 15 y 25 ml la tendencia a clarificar vuelve a presentarse luego de 72 h de actuación del mismo. En la

Tabla 4 se muestra el análisis de varianza con los estadísticos desglosados.

Las Variables Volumen y Tiempo según Tabla 2.

Tabla 4. Análisis de varianza para absorbancia.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Variedad	0.0527728	1	0.0527728	10.19	0.0020
B:Volumen Clarificante	0.0784693	1	0.0784693	15.15	0.0002
C:Tiempo	0.332761	1	0.332761	64.26	0.0000
AB	0.0434855	1	0.0434855	8.40	0.0048
AC	0.0219945	1	0.0219945	4.25	0.0424
BB	0.0242948	1	0.0242948	4.69	0.0331
BC	0.0001882	1	0.0001882	0.04	0.8493
CC	0.00303718	1	0.00303718	0.59	0.4459
bloques	0.0072595	2	0.00362975	0.70	0.4989
Error total	0.440128	85	0.00517798		
Total (corr.)	2.14681	95			

R-cuadrada = 79.4985 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 77.0865 por ciento

Error estándar del est. = 0.0719581

Error absoluto medio = 0.0565532

Estadístico Durbin-Watson = 0.658179 (P=0.0000)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.665934

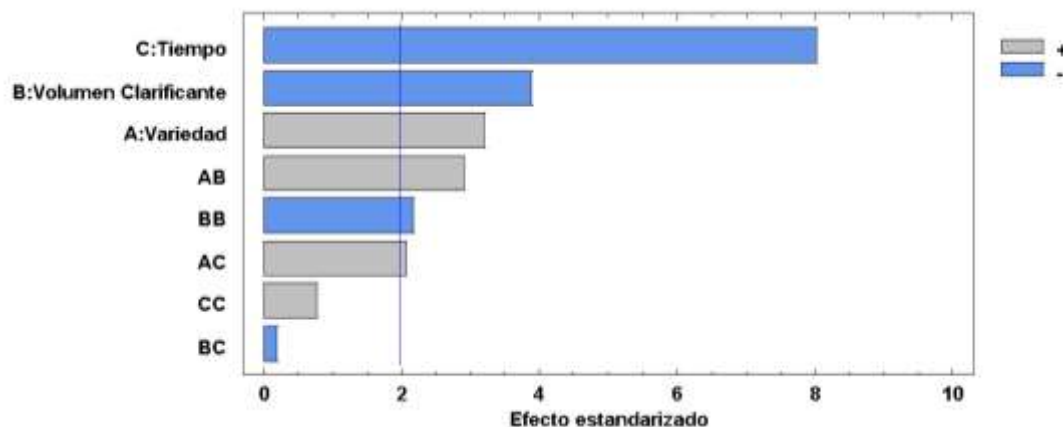


Fig. 5. Diagrama de Pareto para la absorbancia

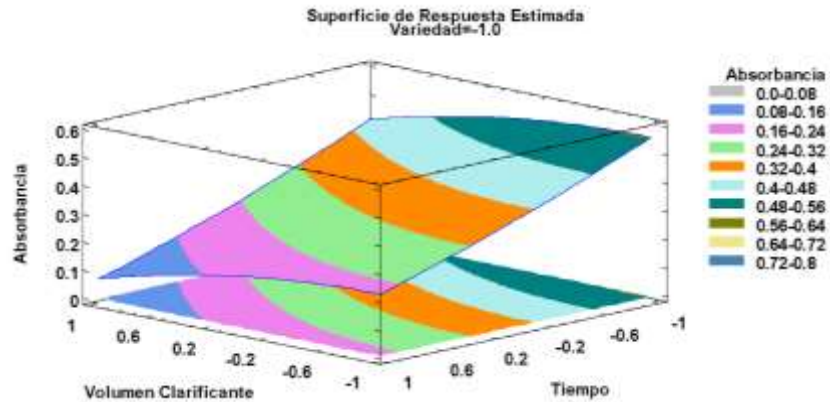


Fig. 6. Superficie de respuesta de los niveles de volumen de clarificante y tiempo para papaya.

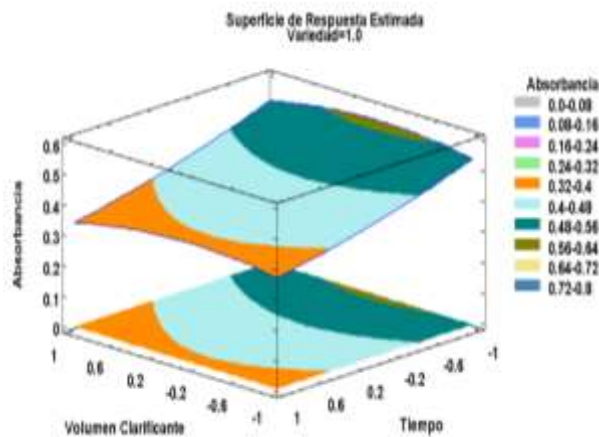


Fig. 7. Superficie de respuesta de los niveles de volumen de clarificante y tiempo para guayaba.

Selección del concentrado enzimático más adecuado para clarificar la bebida alcohólica a base de merey

Comparando los valores obtenidos de absorbancia, se puede apreciar en la Figura 1 que para el clarificante de guayaba hay un aumento súbito al adicionar el primer volumen de clarificante, esto debido a que el concentrado enzimático posee físicamente un color más

oscuro provocando que al adicionarse al vino, este se torne de igual color y aumente la absorbancia medida en el espectrofotómetro UV. Sin embargo, al agregar más clarificante este comienza a disminuir, debido al tiempo de actuación y reposo al que estuvo sometido, lo que se traduce en una despectinización (Cerreti *et al.*, 2016; Pinelo *et al.*, 2010).

Caso contrario ocurre con el de papaya, que tiene un color más claro y al adicionarse al vino, la absorbancia disminuye en los primeros volúmenes de clarificante con el aumento de la concentración de la enzima. Lo cual es una ventaja ya que las medidas son favorables indicando mejoras en la apariencia de la bebida alcohólica. Sin embargo, para el volumen final aumenta la absorbancia, lo que parece indicar que el clarificante en exceso pierde actividad enzimática posiblemente por desnaturalización proteica, y por tanto no continúa la hidrólisis de las cadenas de pectinas. Este hecho puede deberse a una subida de temperatura ocasionada en la manipulación de las muestras o por otros efectos que aún se desconocen y que hay que estudiar en futuras investigaciones.

Artículos

Una muestra de la bebida alcohólica con ambos clarificantes se puede apreciar en la Figura 8.



Fig. 8. Bebida alcohólica a base de merey con clarificante (a) Papaya, (b) Guayaba

Para la selección del volumen de clarificante se emplearon tres muestras como se observa en la Tabla 5, además la aplicación de una prueba de degustación a una población de 20 personas inexpertas para verificar la preferencia del vino clarificado después de 72 h de actuación.

Tabla 5. Muestras empleadas para la selección del volumen de clarificante.

Fruta	Muestra	Volumen de vino (ml)	Volumen de clarificante (ml)
Papaya	A	50	5
	B	50	15
	C	50	25

El modelo de encuesta utilizado fue el de Escala Valorativa Sumatoria, dando como resultado que con una ponderación promedio de 13.9, siendo 15.0 la máxima puntuación total para la escala de valoración, la muestra B fue escogida como la preferida. Los valores de la caracterización para la muestra B fueron los siguientes: pH igual a 3; sólidos solubles 20.1796 °BRIX; acidez titulable 4.864 g (ácido tartárico)/l; grado alcohólico 12.7; densidad 1.2698 g/ml y absorbancia 0.10129. Así mismo, el comportamiento del concentrado enzimático de papaya, empleado como clarificante en una bebida alcohólica a base de merey, presenta una tendencia aceptable en los resultados obtenidos; en comparación con estudios realizados por diversos autores para mejorar la

aparición de vinos blancos utilizando clarificantes comerciales y/o convencionales (Fugelsang & Edwards, 2007). Luego de aplicar la encuesta, se concluyó que el mejor sabor del vino se logró al agregar 5 mL de concentrado enzimático de papaya para lograr la clarificación.

Finalmente, para preparar 300 ml de bebida alcohólica clarificada a base de merey, se emplearon 30 ml de concentrado enzimático de papaya, y se pasteurizó a una temperatura de 100°C a una presión de 1.5 psi y seguidamente se sometió a un enfriamiento súbito a 4°C.

Evaluación sensorial de las características del producto obtenido en el proceso de clarificación

La prueba hedónica aplicada en la presente investigación fue analítica de tipo discriminativa

por el método de diferenciación, empleando la técnica pareada, que consiste en evaluar simultáneamente dos muestras, con el objetivo de determinar si existe diferencia perceptible entre ellas. En este caso, una muestra con clarificante de papaya y otra sin clarificante. Para desarrollar este procedimiento se aplicó la encuesta a un total de 50 personas no entrenadas. Las características evaluadas en la prueba hedónica son: brillo y limpidez, aroma, color, sabor y aceptabilidad.

Se pudo constatar que el vino clarificado con concentrado enzimático de papaya obtuvo un porcentaje de 52% y el vino sin clarificar 36%; es decir, que en comparación con otros vinos frutales, éste es aprobado por la mayoría de los degustadores generando expectativas a futuro para la comercialización de vinos clarificados con concentrados enzimáticos obtenidos a partir de frutas de procedencia nacional.

CONCLUSIONES

La bebida alcohólica obtenida empleando un concentrado enzimático de papaya, se encuentra dentro de los rangos establecidos por las normas COVENIN empleadas para la caracterización. Los valores de sólidos solubles, pH, acidez titulable, grados alcohólicos y densidad obtenidos para el vino clarificado fueron aceptables comparados con estudios realizados por otros autores. Las mediciones de absorbancia demuestran que la bebida alcohólica a base de Merey con clarificante de papaya cumple con el espectro de absorbancia de un vino blanco, para ello fue necesario un tiempo de actuación de 72 h del clarificante

enzimático con un valor de absorbancia de 0.10129. El brillo y limpidez tuvo una preferencia de 53% en el vino clarificado respecto al vino sin clarificar. La aceptabilidad en general tuvo un 73% de aprobación en el vino clarificado, generando así una expectativa de comercialización a futuro.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al personal del Laboratorio de Biotecnología Industrial (LABIOT) y al Centro de Investigaciones Químicas (C.I.Q) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Carabobo, por colaborar con el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

- Acosta D (2014) Elaboración y control de calidad de vino de feijoa (*Acca sellowiana berg*), a partir de frutos con corteza y sin ella. Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Ecuador.
- Araujo S, Ferraz C, Silveira J, Narain N & Souza R. (2011) Biotechnological process for obtaining new fermented products from cashew apple fruit by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 38 (9):1161-9.
- Argaiz A & López-Malo, A. (1996) Kinetics of first change on flavour, cooked flavour development and pectinesterase inactivation on mango and papaya nectars and purees. *Rev Esp Cien Tec Ali.* 35 (1): 92-100.

Artículos

- Arrázola G, Núñez M & Osorio J (2013) Clarificación de jugo de la manzana de marañón (*Anacardium occidentale* L.) por tratamiento enzimático. *Rev MVZ Cordoba*. 18 (1): 3722-3730.
- Ashurst P (2005) Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices. Second Edition. Blackwell Publishing, United Kingdom. ISBN: 1-4051-2286-2.
- Cerreti M, Liburdi K, Benucci I & Esti M (2016) The effect of pectinase and protease treatment on turbidity and on haze active molecules in pomegranate juice. *LWT-Food Sci Technol*. 73: 326-333.
- Codex Alimentarius (2005) Norma general del Codex para zumos (jugos) y néctares de frutas (CODEX STAN 247-2005).
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) (1977) Frutas y sus derivados. Determinación de la acidez. Norma 1151.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) (1979) Alimentos. Determinación de pH. Norma 1315.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) (1981) Néctares y frutas. Consideraciones generales. Norma 1031.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) (1983) Determinación de sólidos solubles. Norma 924.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) (1997) Vino y sus derivados. Determinación de la Acidez total. Norma 3286.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) (1997) Vino y sus derivados. Requisitos. Norma 3342.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). (1993) Bebidas alcohólicas. Determinación del grado alcohólico. Norma 3042.
- Desrosier N (1977) Elements of Food Technology. Avi Pub Co. USA. ISBN-10: 0870552457. ISBN-13: 978-0870552458
- Espinal M (2010) Capacidad antioxidante y ablandamiento de la guayaba Palmira. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- Ezeronye O (2004) Nutrient utilization profile of *Saccharomyces cerevisiae* from palm wine in tropical fruit fermentation. *A Van Leeuw J Microb*. 86: 235-240.
- Flores E (2004) Desarrollo de una Bebida Funcional de Maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). Tesis de Maestría. Universidad de las Américas Puebla. México.
- Fugelsang K & Edwards C (2007) Wine microbiology. Segunda edición. Editorial Springer Science Business Media, LLC. USA. pp. 115-137. ISBN-13: 978-0387333410. ISBN-10: 038733341X.
- González-San José M, Izcara E, Pérez-Magariño S & Reilla I (2013) Efecto del uso de enzimas pectinolíticas sobre los aspectos tecnológicos y visuales de mostos e vinos. X Congreso Brasileño de Viticultura y Enología, Universidad de Burgos. España.
- Guerrero R, Lugo L, Marín M, Beltrán O, León G & Rincón F (2008) Caracterización fisicoquímica del fruto y pseudofruto del Merey *Anacardium occidentale* L. (Merey) en condiciones de secado. *Rev Fac Agron LUZ*. 25: 81-94.

- Gutierrez H & De la Vara R (2008). Análisis y Diseño de Experimentos. Mc Graw Hill. México. ISBN-10: 970-10-6526-3. ISBN-13: 978-970-10-6526-6.
- Mohanty S, Ray P, Swain MR & Ray RC (2006) Fermentation of cashew (*Anacardium occidentale L.*) "Apple" into wine. *J Food Process Pres.* 30: 314–322.
- Mondal K, Malhotra SP, Jain V & Singh R (2009) Partial purification and characterization of pectinmethylesterase from ripening guava (*Psidium guajava L.*) fruits. *Acta Physiol Plant.* Haryana, India. 31: 81–87.
- Nagodawhitana T & Reed G (1993) Enzymes in Food Processing. Third Edition. Food Science and Technology. International series. pp. 7-67/363-392.
- Pinelo M, Zeuner B & Meyer A (2010) Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food Bioprod Process.* 88 (2-3): 259–265.
- Ribéreau-Gayon P (2003) Tratado de Enología. Volumen II. Química del Vino. Estabilización y Tratamientos. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. ISBN: 9789505045716.
- Ridley BL, O'Neil MA & Mohnen D. (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide – related signaling. *Phytochemistry.* 57 (6): 929-967.
- Thakur BR, Singh RK & Handa AK (1997) Chemistry and uses of pectin – A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 37 (1): 47-73.
- Torres A, Da Silva M, Barros W, Swarnakar R & Honorato L (2006) Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale L.*). *Quim. Nova* 29 (3): 489-492. Brazil.
- Whitaker J (1994) Principles of enzymology for the food sciences. Second Edition. Marcel Dekker. Inc. Davis, California. pp. 426-435. ISBN 0824791487.
- Willats WG, Knox JP & Mikkelsen JD (2006) Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci Tech.* 17: 97-104.
- Yahaya L, Aliyu O, Hammed L & Aroyeun S (2010) La variación en las características fisicoquímicas del manzano del anacardo (*Anacardium occidentale L.*) en maduración. *Brit Food J.* 112: 93–9

¿Cómo abordar el estudio de una proteína hipotética? el caso de la proteína SCO2127 de *Streptomyces coelicolor*

Víctor Tierrafría y Sergio Sánchez

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, 04510.

E-mail: vtierrafría@gmail.com

RESUMEN

En *Streptomyces coelicolor*, como en muchos otros organismos, la producción de enzimas extracelulares y la síntesis de antibióticos están sujetas a regulación por carbono. La caracterización de mutantes insensibles a regulación por carbono sugirió que la proteína hipotética codificada por el gen *sco2127* juega un papel importante en este mecanismo regulatorio. Sin embargo, ha sido extremadamente difícil determinar su función debido a la falta de homología de secuencia con otras proteínas regulatorias ya conocidas. En esta revisión hacemos un recorrido sobre el estudio de *sco2127* que va desde la complementación genética clásica de mutantes insensibles a regulación por carbono y la expresión heteróloga de la proteína *sco2127* en *Escherichia coli*, hasta la creación de mutantes dirigidas y el análisis de la información obtenida por distintos acercamientos a escala genómica. Aunque estos estudios han brindado algunas pistas sobre el funcionamiento de *sco2127* y recientemente, sobre las consecuencias fenotípicas de su delección, la investigación relacionada con esta proteína debe continuar para conocer su participación específica en la fisiología del actinomiceto modelo *S. coelicolor*.

Palabras clave: *Regulación por carbono, mutantes, represión, secuenciación, glucosa cinasa, metabolismo secundario, Streptomyces,*

ABSTRACT

As in other microorganisms, production of extracellular enzymes and the synthesis of antibiotics in *Streptomyces coelicolor* is subject to carbon regulation. Characterization of mutants insensitive to carbon regulation suggested that the hypothetical protein encoded by the *sco2127* gene plays an important role in this regulatory mechanism. However, mainly due to the lack of sequence homology with other known regulatory proteins, it has been extremely difficult to determine the *sco2127*

function. In this review a scientific tour on the study of *sco2127* was performed, starting with a classic genetic complementation of regulatory mutants insensitive to carbon source regulation. The study continued with the heterologous expression of *sco2127* in *Escherichia coli*, the construction of directed mutants and ended with information analysis obtained from different approaches at the genomic scale. Although some of these studies have given some clues about the *sco2127* function and recently about the phenotypic consequences of its deletion, the research related to this protein must continue in order to know its specific participation in the physiology of the actinomycete model, *S. coelicolor*.

Key words: Carbon regulation, mutants, repression, sequencing, glucose kinase, secondary metabolism, *Streptomyces*.

INTRODUCCIÓN

Los estreptomicetos son bacterias Gram-positivas con alto contenido de G+C que habitan el suelo y ambientes marinos principalmente. Estos organismos producen una gran variedad de productos naturales que incluyen enzimas extracelulares, herbicidas, antitumorales y antibióticos. De hecho, la relevancia económica e industrial de los estreptomicetos radica en su capacidad para producir poco más de la mitad de los antibióticos producidos por microorganismos (Demain 2014). Esto se debe a que los estreptomicetos poseen un elevado número de grupos de genes o “clústeres” dedicados a la síntesis de metabolitos secundarios, los cuales fueron descubiertos al secuenciar el genoma de especies como *Streptomyces coelicolor* (22 clústeres), *Streptomyces avermitilis* (30 clústeres) y *Streptomyces griseus* (34 clústeres) (Bentley et al. 2002; Ikeda et al. 2003; Ohnishi et al. 2008). Aunque esta revelación sugiere que los estreptomicetos tienen un gran potencial para el desarrollo y

producción de nuevos antibióticos, la mayoría de estos clústeres desafortunadamente no han podido expresarse en condiciones de laboratorio. Esto puede deberse a varios factores, sin embargo, algunos autores han propuesto que la razón principal ha sido la intrincada red de regulación que controla su formación. Lo anterior adquiere sentido si consideramos que la secuenciación genómica de los estreptomicetos también reveló un número sin precedente de genes relacionados con diversos sistemas de regulación. Por ejemplo, en *S. coelicolor*, se encontró que el número de genes asociados con alguna función regulatoria al menos duplica la cantidad de genes involucrados en la síntesis de productos naturales (Bentley et al. 2002).

En las bacterias del género *Streptomyces*, como en muchos otros organismos, la síntesis de productos naturales está sujeta a regulación por carbono. Este sistema de regulación inhibe la expresión de los genes o la actividad de las proteínas involucradas en la utilización de diversas fuentes de carbono, así como la

biosíntesis de productos naturales, en presencia de una fuente de carbono preferencial (Görke and Stülke 2008). Los primeros estudios de regulación por carbono en *S. coelicolor* sugirieron que el gen *sco2127*, o su producto de expresión, podrían jugar un papel importante en este mecanismo, y aunque actualmente se sabe que la proteína *sco2127* no es la única responsable de la regulación por carbono, aún se desconoce su función específica. En esta revisión hacemos un recorrido por los distintos estudios realizados para tratar de comprender la participación de *sco2127* en la fisiología de *S. coelicolor*. Nosotros creemos que esta revisión es un claro ejemplo de cómo puede abordarse el estudio de una proteína hipotética.

AISLAMIENTO Y COMPLEMENTACIÓN DE MUTANTES INSENSIBLES A REGULACIÓN POR CARBONO

Con la finalidad de obtener mutantes insensibles a regulación por carbono, en 1982 David Hodgson incubó a *S. coelicolor* en presencia de 2-desoxiglucosa (dog), un análogo tóxico de la glucosa, y arabinosa, una fuente de carbono cuya utilización se reprime en presencia de glucosa (Hodgson 1982). Este experimento dio como resultado la aparición de mutantes insensibles a regulación por carbono, es decir, cepas que adquirieron la capacidad de utilizar arabinosa a pesar de la presencia de 2-dog, o visto de otra manera, cepas resistentes a 2-dog, por lo que fueron nombradas dogR. Algunas de

estas mutantes fueron incapaces de utilizar glucosa como única fuente de carbono y solamente un año después, se comprobó que dichas mutantes habían perdido su actividad glucosa cinasa (Seno and Chater 1983). Posteriormente, Ikeda y colaboradores demostraron que las mutantes dogR incapaces de crecer en glucosa eran complementadas con un fragmento de DNA de aproximadamente 3.5 kb y por lo tanto, sugirieron que esta secuencia debía contener al gen *glk* (Ikeda et al. 1984).

IDENTIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN POR CARBONO

La secuencia del fragmento mencionado anteriormente reveló la presencia de dos genes denominados ORF2 y ORF3 (actualmente conocidos como *sco2127* y *glk*, respectivamente). El primer gen (*sco2127*) no presentó (ni presenta hasta el momento) homología de secuencia con ningún gen de función conocida. Sin embargo, el segundo gen (*glk*, glucosa cinasa) mostró alrededor del 50% de similitud con distintas proteínas represoras de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus pentosus* y *E. coli*, pero a diferencia de estas, carece de un dominio de unión a DNA en su extremo amino terminal. Cuando se realizó el análisis transcripcional de *sco2127* y *glk*, se encontró que, aunque ambos genes se transcriben como una sola unidad en medio mínimo, la expresión de *glk* es mayor que la expresión de *sco2127*, lo cual sugiere que el gen *glk* se transcribe desde dos promotores

distintos localizados río arriba de *sco2127* y *glk*, respectivamente (Angell et al. 1992).

Posteriormente, se usaron dichos genes juntos, o por separado, para estudiar su participación en la regulación por carbono y se observó que las mutantes *dogR* transformadas con *sco2127* y *glk*, o únicamente con *glk*, restablecieron su sensibilidad a 2-dog y su capacidad para utilizar glucosa, lo cual era de esperarse debido a la presencia del gen *glk* en ambos casos. Cuando estos autores estudiaron el efecto de estas construcciones sobre la represión por carbono (analizada en función de la expresión del promotor de la agarasa), observaron que las mutantes *dogR* transformadas únicamente con el gen *glk* disminuían parcialmente la expresión del promotor de la agarasa en presencia de glucosa. Esta observación llevó a los autores de este trabajo a proponer que el gen *glk* era el responsable de la represión por carbono, sin embargo, es importante señalar que la represión total del promotor de la agarasa solamente ocurrió cuando el gen *glk* estuvo acompañado del gen *sco2127* (Angell et al. 1992).

En base a lo anterior, y con la firme idea de que el responsable de la represión por carbono era el gen *glk*, los autores de este trabajo sugirieron que el gen *sco2127* no tenía ninguna participación en este proceso, y que la complementación de las mutantes *dogR* transformadas con ambos genes simplemente se debía al incremento en la expresión de *glk* desde el promotor localizado río arriba de *sco2127*. Sin

embargo, estos mismos autores se llevaron una sorpresa solo un par de años después, cuando demostraron que la sobreexpresión del gen *glk*, y por lo tanto el incremento de la actividad glucosa cinasa en distintas mutantes *dogR* era incapaz de restablecer la represión por carbono del promotor de la agarasa (Angell et al. 1994). Aunque Angell y colaboradores ignoraron por completo la participación de *sco2127* en la regulación por carbono, nosotros consideramos que estos resultados eran evidencia suficiente para creer que el gen *sco2127*, o su producto de expresión, cualquiera que sea su función, jugaba un papel importante en dicho mecanismo.

ANÁLISIS DEL GEN *sco2127* EN OTROS ORGANISMOS RELACIONADOS

El fenómeno de RCC también se estudio en *Streptomyces peucetius* variedad *caesius* (SPVC), una mutante obtenida de la cepa silvestre *S. peucetius* debido a su capacidad para producir doxorubicina (Arcamone et al. 1969), un compuesto de tipo policétido similar a la daunorubicina. Ambos compuestos son conocidos como antraciclinas y han sido usados para combatir distintos tipos de cáncer debido a su capacidad antiproliferativa (Strauss 1978).

Similar a lo ocurrido con la expresión del promotor de la agarasa en *S. coelicolor*, en SPVC se observó que la producción de β -galactosidasa y de antraciclinas (elegidos como ejemplos del metabolismo primario y secundario, respectivamente) también estaba sujeta (disminuía) a RCC. Además se

demonstró que la concentración de ambos compuestos aumentaba en las mutantes dogR a pesar de la presencia de glucosa (Segura et al. 1996; Escalante et al. 1999; Ramos et al. 2004), revelando de esta manera que el fenómeno de RCC está ampliamente distribuido entre los estreptomicetos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en *S. coelicolor*, en SPVC también se descubrió que la actividad glucosa cinasa de las mutantes dogR, y por lo tanto, resistentes a RCC, disminuía considerablemente con respecto a la cepa parental (Segura et al. 1996; Ramos et al. 2004). Aunque esto sugería una vez más que la enzima glucosa cinasa era la responsable de la resistencia a RCC, esta hipótesis quedó descartada con la identificación de mutantes sensibles a dog (dogS), pero resistentes a RCC, las cuales tenían una actividad glucosa cinasa similar a la observada en la cepa silvestre (Ramos et al. 2004). Aunado a esto, Ramos y colaboradores demostraron por primera vez que la secuencia del gen glk de las mutantes dogR de SPVC (consideradas como mutantes puntuales debido a que mostraron una señal positiva en experimentos de southern blot donde un fragmento que contenía los genes sco2127 y glk se había usado como sonda radioactiva) era idéntica a la secuencia del gen silvestre, confirmando contundentemente (i) que las mutantes dogR no necesariamente tienen deleciones o mutaciones puntuales en el gen glk, o en esa región del cromosoma, y (ii) que ni el gen glk, ni la actividad asociada a su producto de expresión (por sí solos) son responsables del

fenómeno de RCC en *Streptomyces*. Sin embargo, los autores de este trabajo encontraron una correlación directa entre el transporte de glucosa y la RCC, al observar que el transporte de glucosa disminuía únicamente en las mutantes insensibles a RCC, independientemente de su actividad glk.

A pesar de que Ramos y colaboradores habían demostrado que las mutantes dogR de SPVC conservaban el gen glk, en 2005 se hicieron experimentos de complementación genética, similares a los realizados previamente en *S. coelicolor* (Angell et al. 1992; Angell et al. 1994), donde se probó la capacidad de sco2127 y de glk (juntos o por separado) para restablecer la regulación por carbono en distintas mutantes dogR de SPVC (Guzman et al. 2005). Para esto, primeramente se investigó la presencia de genes homólogos a sco2127 y glk de *S. coelicolor* en SPVC, donde se observó que ambos genes están localizados en la misma región del cromosoma (Guzman et al. 2005), y ahora se sabe que también están organizados en un arreglo similar al encontrado en *S. coelicolor* (Angell et al. 1992). Posteriormente y de manera inesperada, se encontró que el perfil de producción de antraciclinas de las mutantes insensibles a RCC de SPVC transformadas únicamente con el gen sco2127 de *S. coelicolor*, era similar al de la cepa silvestre (Guzman et al. 2005). Aunque estas observaciones contrastaban con los resultados obtenidos en *S. coelicolor* (donde el gen sco2127 por sí solo era incapaz de restablecer la RCC de algunas mutantes

dogR), apoyaban fuertemente la idea de que sco2127 jugaba un papel importante (probablemente indispensable) en la regulación por carbono (Angell et al. 1992; Angell et al. 1994). Los estudios realizados en SPVC, adicionalmente confirmaron que existe una relación directa entre el transporte de glucosa y la RCC, y probablemente también entre estos dos aspectos y el gen sco2127, ya que únicamente las cepas transformadas con dicho gen y que habían mejorado su capacidad de transporte con respecto a las mutantes dogR, recuperaron también su sensibilidad a RCC (Guzman et al. 2005).

EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA SCO2127

En 2009, Chávez y colaboradores clonaron y expresaron por primera vez el gen sco2127 de *S. coelicolor* en *E. coli* para purificar la proteína y poder investigar con mayor detalle su participación en la RCC. Estos autores detectaron la presencia de la proteína sco2127 en extractos intracelulares tanto de *S. coelicolor* como de SPCV (Chávez et al. 2009). Además de asegurar que sco2127 es una proteína soluble, esta observación confirmó que dicha proteína conserva un alto grado de similitud entre ambos organismos (hasta el 61% de similitud en algunos fragmentos), y sugirió fuertemente que su participación en los estreptomicetos podría estar altamente conservada. De acuerdo con esto, es importante señalar que únicamente los

estreptomicetos contienen proteínas con una secuencia de aminoácidos similar a la de la proteína sco2127.

En cultivos de *S. coelicolor* crecidos en medio mínimo y suplementados con glucosa como única fuente de carbono, se observó que la proteína sco2127 se expresa principalmente durante la fase de crecimiento exponencial (Chávez et al. 2009), o visto de otra manera, que se requiere cierta concentración de glucosa para que la proteína sco2127 pueda expresarse, lo cual era consistente con su posible participación en el transporte y/o metabolismo de la glucosa. Sin embargo, la expresión de sco2127 en medio complejo mostró un comportamiento distinto. En estas condiciones, la proteína sco2127 no se detectó durante el inicio de la fermentación (donde había plena disponibilidad de glucosa), sino hasta la fase estacionaria de crecimiento (donde la concentración de glucosa había disminuido considerablemente con respecto al inicio de la fermentación) (Chávez et al. 2011). Este resultado sugería que la expresión de la proteína sco2127 no dependía únicamente de la concentración de glucosa (como se había propuesto en trabajos anteriores), sino que estaba influenciada por la presencia de otros nutrientes en el medio de cultivo

ENSAYOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA

La purificación de la proteína sco2127 también permitió la realización de experimentos enfocados en demostrar su

posible interacción con otras proteínas. De acuerdo con algunas observaciones previas (Angell et al. 1992; Angell et al. 1994; Ramos et al. 2004; Guzman et al. 2005), se esperaba encontrar interacciones entre sco2127 y la glucosa cinasa o la glucosa permeasa, sin embargo, Chávez y colaboradores demostraron que, en medio complejo, sco2127 únicamente se unía (por separado) a las proteínas codificadas por los genes sco5113 y sco2582 (Chávez et al. 2011). La proteína SCO5113 (BldKB) es una proteína de unión a ligando que pertenece a un sistema de transporte tipo ABC que permite la obtención de un péptido necesario para la diferenciación morfológica en *S. coelicolor* (Nodwell and Losick 1998). Debido a que este tipo de proteínas se han visto involucradas en el transporte diversos compuestos, incluyendo carbohidratos (Holland and Blight 1999), y considerando que el funcionamiento de BldKB pueda verse favorecido con la interacción BldKB-sco2127, se planteó la posibilidad de que BldKB también pudiera transportar glucosa, lo cual explicaría la habilidad de sco2127 para restablecer el transporte de glucosa, y en consecuencia, la RCC de algunas mutantes dogR de SPVC. Sin embargo, el transporte de glucosa a través de BldKB no ha sido comprobado experimentalmente. A diferencia de BldKB, la metalloproteasa codificada por el gen sco2582 ha sido poco estudiada, aunque recientemente se observó que también es necesaria para la formación de esporas en *S. coelicolor* (datos no publicados).

Aunque estas observaciones también cuestionaron la participación de sco2127 en el transporte o metabolismo de la glucosa, es importante destacar que las diferencias en las conclusiones sobre de funcionamiento de sco2127 pueden deberse simplemente a variaciones en las condiciones de crecimiento. A pesar de esto, los estudios de interacción proteína-proteína realizados en medio complejo (Chávez et al. 2011) advirtieron por primera vez que la proteína sco2127 podría estar relacionada con la diferenciación morfológica en *S. coelicolor*.

DELECIÓN DEL GEN *sco2127* DE *S. COELICOLOR*

Otro tipo de acercamientos que ofrecen información relevante acerca del funcionamiento de proteínas hipotéticas en distintos procesos celulares es la delección dirigida del gen que las codifica. En este sentido, la delección del gen sco2127 de *S. coelicolor* (Forero et al. 2012) fue fundamental para conocer su participación en la RCC. La mutante sco2127 de *S. coelicolor* mostró una disminución (y no un incremento como se esperaba) de hasta el 90% en la formación de actinorrodina con respecto a la cepa silvestre (Tierrafría et al. 2016). Adicionalmente, la mutante sco2127, así como la cepa silvestre M145 mostraron una disminución similar en el perfil de producción de actinorrodina al aumentar la concentración de glucosa, ya sea en medio mínimo o en medio complejo, lo cual sugirió que ambas cepas estaban sujetas a regulación por carbono (datos no publicados). Estos

resultados descartaron que el gen *sco2127* o su producto de expresión fueran los únicos responsables de la RCC, lo cual era consistente con lo reportado por Jiménez y colaboradores, quienes demostraron la ausencia de mutaciones puntuales o deleciones en la secuencia del homólogo de *sco2127* en las mutantes de SPVC resistentes a RCC (Jiménez et al. 2012).

ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA MUTANTE Δ SCO2127 USANDO DISTINTOS ACERCAMIENTOS A ESCALA GENÓMICA

Aunque la deleción del gen *sco2127* de *S. coelicolor* permitió descartar su participación en la RCC, la falta de similitud de *sco2127* con proteínas de función conocida, así como la ausencia de dominios funcionales en su secuencia, han impedido conocer la función específica de esta proteína. A pesar de esto, es posible analizar las consecuencias de su deleción mediante el análisis de datos obtenidos por distintos acercamientos a escala genómica. En nuestro laboratorio, recientemente se compararon los perfiles de expresión de proteína tanto de la mutante *sco2127* como de la cepa silvestre mediante espectrometría de masas y se demostró que la producción de actinorrodina en la mutante 2127 de *S. coelicolor* está mediada por un estrés oxidativo que depende a la vez de la expresión del regulador de respuesta SCO0204. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para poder explicar por qué la deleción del gen *sco2127* genera un estrés oxidativo.

CONCLUSIONES

Hasta donde sabemos, en esta revisión hemos abordado todos los trabajos relacionados con el estudio de la proteína hipotética *sco2127*. Las deleciones y complementaciones genéticas en vectores de diversas características, la clonación y expresión de *sco2127* en sistemas heterólogos, la purificación del producto de expresión de dicho gen para la producción de anticuerpos específicos, los ensayos de interacción proteína-proteína y recientemente la deleción del gen *sco2127*, complementada con el análisis de datos obtenidos mediante acercamientos a escala genómica, son solo algunas técnicas usadas para tratar de comprender la participación de *sco2127* en la fisiología del actinomiceto modelo *S. coelicolor*. Estos acercamientos han descartado contundentemente la participación de *sco2127* en el fenómeno de regulación por carbono, sin embargo aún se desconoce la función específica de esta proteína. Para abordar esta problema, y tomando en cuenta que la proteína *sco2127* ya ha sido purificada (Chávez et al. 2009), nosotros creemos que es necesario cristalizar dicha proteína para poder realizar análisis estructurales. En la literatura existen varios casos de proteínas que muestran homología estructural con otras proteínas de función conocida, a pesar de que su secuencia de aminoácidos sea totalmente distinta. Estos estudios representan una alternativa para el estudio de proteínas difíciles de caracterizar y pueden ofrecer

pistar adicionales acerca de su funcionamiento.

Abreviaturas:

RCC: Regulación catabólica por carbono.

dog: 2-desoxiglucosa

dogR: Resistencia a dog

dogS: Sensibilidad dog

SPVC, *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.

AGRADECIMIENTOS

V. Tierrafría es estudiante del programa de doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM. Se agradece el Apoyo Económico del proyecto CONACYT, México CB-219686.

REFERENCIAS

- Angell S, Lewis C, Buttner M, Bibb M (1994) Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol. Gen. Genet.* 244:135-143.
- Angell S, Schwarz E, Bibb M (1992) The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* 6:2833-2844.
- Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C (1969) Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* 11:1101-1110.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga A-M, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang C-H, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream M-A, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417:141-147. doi: 10.1038/417141a
- Chávez A, Forero A, Sánchez M, Rodríguez-Sanoja R, Mendoza-Hernández G, Servín-Gonzalez L, Sánchez B, García-Huante Y, Rocha D, Langley E, Ruiz B, Sánchez S (2011) Interaction of SCO2127 with BldKB and its possible connection to carbon catabolite regulation of morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:799-806. doi: 10.1007/s00253-010-2905-8
- Chávez A, García-Huante Y, Ruiz B, Langley E, Rodríguez-Sanoja R, Sanchez S (2009) Cloning and expression of the sco2127 gene from *Streptomyces coelicolor* M145. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36:649-54. doi: 10.1007/s10295-009-0533-z
- Demain AL (2014) Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41:185-201. doi: 10.1007/s10295-013-1325-z
- Escalante L, Ramos I, Imriskova I, Langley E,

- Sánchez S (1999) Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:572-8.
- Forero A, Sánchez M, Chávez A, Ruiz B, Rodríguez-Sanoja R, Servín-Gonzalez L, Sánchez S (2012) Possible involvement of the sco2127 gene product in glucose repression of actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor*. *Can. J. Microbiol.* 58:1195-201.
- Görke B, Stülke J (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* 6:613-624. doi: 10.1038/nrmicro1932
- Guzman S, Carmona A, Escalante L, Imriskova I, López R, Rodríguez-Sanoja R, Ruiz B, Servín-González L, Sánchez S, Langley E (2005) Pleiotropic effect of the sco2127 gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Microbiology* 151:1717-1723. doi: 10.1099/mic.0.27557-0
- Hodgson DA (1982) Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen. Microbiol.* 128:2417-2430.
- Holland I, Blight M (1999) ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J. Mol. Biol.* 293:381-99.
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Ōmura S (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* 21:526-531. doi: 10.1038/nbt820
- Ikeda H, Seno ET, Bruton CJ, Chater KF (1984) Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* 196:501-507.
- Jiménez A, Cabrera B, Cordero F, Ruiz-Villafán B, Rodríguez-Sanoja R, Tierrafría VH (2012) sp2563 nor its orthologue sco2127 seem to be the only factors eliciting carbon catabolite repression in two *Streptomyces* strains. *BioTecnología* 16:34-43.
- Nodwell JR, Losick R (1998) Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 180:1334-1337.
- Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita a., Hattori M, Horinouchi S (2008) Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* 190:4050-4060. doi: 10.1128/JB.00204-08
- Ramos I, Guzmán S, Escalante L, Imriskova I, Rodríguez-Sanoja R, Sanchez S, Langley E (2004) Glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius*

Artículos

- var. *caesius*. *Res. Microbiol.* 155:267-274. doi: 10.1016/j.resmic.2004.01.004
- Segura D, González R, Rodríguez R, Sandoval T, Escalante L, Sánchez S (1996) *Streptomyces* mutants insensitive to glucose repression showed deregulation of primary and secondary metabolism. *Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotechnol.* 4:30-36.
- Seno ET, Chater KF (1983) Glycerol catabolic enzymes and their regulation in wild-type and mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* 129:1403-1413.
- Strauss D (1978) Anthracyclines, modern tumos inhibiting agents. *Folia Microbiol. (Praha)* 135:191-193.
- Tierrafría VH, Licona-Cassani C, Maldonado-Carmona N, Romero-Rodríguez A, Centeno-Leija S, Marcellin E, Rodríguez-Sanoja R, Ruiz-Villafán B, Nielsen LK, Sánchez S (2016) Deletion of the hypothetical protein SCO2127 of *Streptomyces coelicolor* allowed identification of a new regulator of actinorhodin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* doi: 10.1007/s00253-016-7811-2



www.smbb.com.mx