



Biotecnología y Ciencias Alimentarias

como herramientas de solución
a problemáticas actuales

• Coordinadores:
Dr. Iram Mondaca Fernández
Mtra. Eunice Guzmán Fierros
Dr. Héctor Arvayo Enríquez
Dra. Ruth Gabriela Ulloa Mercado
Dra. Ana María Rentería Mexía
Dra. María Isabel Estrada Alvarado
Dr. Roberto Rodríguez Ramírez

**Biotecnología y ciencias alimentarias
como herramientas de solución a
Problemáticas actuales**

Coordinadores:

Dr. Iram Mondaca Fernández

Mtra. Eunice Guzmán Fierros

Dr. Héctor Arvayo Enríquez

Dra. Ruth Gabriela Ulloa Mercado

Dra. Ana María Rentería Mexía

Dra. María Isabel Estrada Alvarado

Dr. Roberto Rodríguez Ramírez



Instituto Tecnológico de Sonora
5 de febrero, No. 818 sur, colonia Centro
Ciudad Obregón, Sonora, México; 85000
www.itson.mx
Email: rectoria@itson.mx
Teléfono: (644) 410-90-00

Primera edición
ISBN para ebook: 978-607-609-222-4

Gestión editorial y diseño:
Marisol Cota Reyes
Oficina de publicaciones ITSON
marisol.cota@itson.edu.mx

Edición literaria:
Mtra. Eunice Guzmán Fierros

Se prohíbe la reproducción total o parcial de la presente obra, así como su comunicación pública, divulgación o transmisión mediante cualquier sistema o método electrónico o mecánico (incluyendo el fotocopiado, la grabación o cualquier sistema de recuperación y almacenamiento de información), sin consentimiento por escrito del Instituto Tecnológico de Sonora.

Hecho en México



OFICINA DE
PUBLICACIONES
ITSON

Como citar un capítulo de este ebook (se muestra ejemplo del capítulo I):
Terminel-Zaragoza R., Rentería-Mexía A., Ulloa-Mercado G., Serna-Gutiérrez A., Gortáres-Moroyoqui P. y Serrano-Palacios D. (2021). Capítulo I. Calidad de la dieta y variables relacionadas con la salud cardiovascular de adolescentes. *Biotecnología y Ciencias Alimentarias como Herramientas de Solución a Problemáticas Actuales* (pp: 1-10). México: ITSON

DIRECTORIO ITSON

Dr. Jesús Héctor Hernández López

Rector del Instituto Tecnológico de Sonora

Dr. Jaime Garatuza Payán

Vicerrectoría Académica

Dr. Rodolfo Valenzuela Reynaga

Vicerrectoría Administrativa

Dr. Ernesto Uriel Cantú Soto

Secretaría de la Rectoría

Dra. María Elvira López Parra

Dirección Académica de Ciencias Económica-Administrativas

Dr. Armando Ambrosio López

Dirección Académica de Ingeniería y Tecnología

Dr. Pablo Gortáres Moroyoqui

Dirección Académica de Recursos Naturales

Dra. Guadalupe de la Paz Ross Argüelles

Dirección Académica de Ciencias Sociales y Humanidades

Mtro. Mauricio López Acosta

Dirección Unidad Navojoa

Dr. Humberto Aceves Gutiérrez

Dirección Unidad Guaymas

Dr. Iram Mondaca Fernández

Jefe del Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias

COLABORADORES

Comité editorial

Dr. Héctor Arvayo Enríquez
Dr. Iram Mondaca Fernández
Mtra. Eunice Guzmán Fierros
Dra. Ruth Gabriela Ulloa Mercado
Dra. Ana María Rentería Mexía
Dra. María Isabel Estrada Alvarado
Dr. Roberto Rodríguez Ramírez

Comité de arbitraje

Dr. Iram Mondaca Fernández

Profesor-Investigador
Dpto. de Biotecnología y Ciencias Alimentarias ITSON

Dr. Tito Ramón Rentería Gutiérrez

Profesor de Tiempo Completo
UES Hermosillo

Dra. Ana Rosa Baca Ruíz

Jefa de la carrera de Ing. en Tecnología de Alimentos
UES Navojoa

Dra. Ana Karina Blanco Ríos

Responsable del Programa Educativo de Lic. en Tecnología de Alimentos
Dpto. de Biotecnología y Ciencias Alimentarias ITSON

Dra. Edna Rosalva Meza Escalante

Profesor-Investigador
Dpto. de Ciencias del Agua y Medio Ambiente ITSON

Dr. Luis Alberto Cira Chávez

Profesor-Investigador
Dpto. de Biotecnología y Ciencias Alimentarias ITSON

Dra. Ma. Araceli Correa Murrieta

Profesor Investigador Auxiliar
Dpto. de Ciencias del Agua y Medio Ambiente ITSON

M.C. Catalina Mungarro Ibarra

Responsable del Programa Educativo Ing. en Biosistemas
Dpto. de Ciencias Agronómicas y Veterinaria ITSON

M.C. Amada Ofelia Tamayo Maldonado

Profesor por Asignatura
Dpto. de Biotecnología y Ciencias Alimentarias ITSON

Dra. Mayra Arias Gastélum

Profesor-Investigador
Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía
Universidad Autónoma de Sinaloa

Dr. Luis Alonso Leyva Soto

Profesor Cátedras CONACYT
Dpto. de Biotecnología y Ciencias Alimentarias ITSON

Dra. Ana María Rentería Mexía

Profesor-Investigador
Dpto. de Biotecnología y Ciencias Alimentarias ITSON

Mtra. Laura Elisa Gassós Ortega

Profesor-Investigador
Dpto. de Biotecnología y Ciencias Alimentarias ITSON

Dr. Sergio De los Santos Villalobos

Profesor-Investigador
Depto. de Ciencias del Agua y Medio Ambiente ITSON

Dra. María Soledad Vásquez Murrieta

Profesor-Investigador Titular C de Tiempo Completo
Depto. de Microbiología de la ENCB-IPN

Dr. Juan Carlos Coronado Corral

Profesor por Asignatura del DBCA
Dpto. de Biotecnología y Ciencias Alimentarias ITSON

Dr. Luis Humberto Álvarez Valencia

Profesor-Investigador
Depto. de Ciencias Agronómicas y Veterinaria ITSON

Dra. María Isabel Estrada Alvarado

Profesor-Investigador

Dpto. de Biotecnología y Ciencias Alimentarias ITSON

Dra. María del Rosario Martínez Macías

Profesor por Asignatura

Depto. de Ciencias del Agua y Medio Ambiente ITSON

Dr. Héctor Arvayo Enríquez

Profesor por Asignatura

Dpto. de Biotecnología y Ciencias Alimentarias ITSON

Dr. Pablo Luna Nevárez

Profesor-Investigador

Depto. de Ciencias Agronómicas y Veterinaria ITSON

Dr. José Clemente Leyva Corona

Profesor-Investigador

Depto. de Ciencias Agronómicas y Veterinaria ITSON

Dr. Ramón Casillas Hernández

Profesor-Investigador

Depto. de Ciencias Agronómicas y Veterinaria ITSON

Dra. Georgia María González Meza

Profesor por Asignatura

Depto. de Biotecnología y Ciencias Alimentarias ITSON

Dra. Ruth Gabriela Ulloa Mercado

Profesor-Investigador

Dpto. de Biotecnología y Ciencias Alimentarias ITSON

Dr. Roberto Rodríguez Ramírez

Profesor-Investigador

Dpto. de Biotecnología y Ciencias Alimentarias ITSON

PRÓLOGO

Biotecnología y Ciencias Alimentarias como Herramientas de Solución a Problemáticas Actuales es un *e-book* que presenta la compilación de los mejores trabajos en extenso específicamente en las siguientes áreas temáticas: ciencia y tecnología de los alimentos, nutrición, biotecnología industrial, bioingeniería y reproducción vegetal. Todos los trabajos fueron presentados en el Congreso Internacional de Biotecnología y Ciencias Alimentarias realizado en el Instituto Tecnológico de Sonora por el Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, a través de sus Programas Educativos de Ingeniero Biotecnólogo y de Licenciado en Tecnología de Alimentos, en conjunto con los Cuerpos Académicos de Ambiente y Salud, Bioprocesos y Bioproductos, Biotecnología y Ciencias Alimentarias y Biotecnología y Productos Naturales; se llevó a cabo, por primera vez y en su totalidad en modalidad virtual, apoyándonos en la tecnología de comunicación de internet por diversas plataformas de transmisión en línea, siendo un gran reto, y todo un éxito, gracias a la participación de la comunidad científica nacional e internacional a través de académicos y estudiantes de diversas universidades e institutos de investigación.

Dr. Iram Mondaca Fernández
Jefe del Departamento de Biotecnología y
Ciencias Alimentarias.

ÍNDICE

Área temática: **Alimentos**

Capítulo I.

Calidad de la dieta y variables relacionadas con la salud cardiovascular de adolescentes **12**

Capítulo II.

Capacidad antioxidante de alimentos funcionales usando el ensayo del poder antioxidante reductor férrico (FRAP) **19**

Capítulo III.

Diseño documental de programas prerrequisitos para el procesamiento de carne molida de ave **25**

Capítulo IV.

Adición de oxitetraciclina en alimento para camarón y la acumulación máxima en músculo y hepatopáncreas **32**

Capítulo V.

Expresión relativa del gen Decorina de Bovinos y su relación con dureza de la carne **40**

Área temática: **Biotechnología**

Capítulo VI.

Evaluación en la producción de polisacáridos por arqueas halófilas **49**

Capítulo VII.

Desinfección de foliolos de pecanero adulto, durante la temporada, para su cultivo in vitro **55**

Capítulo VIII.

Identificación de Salmonella spp. por PCR en biosólidos de una planta tratadora de agua residuales **62**

Capítulo IX.

Simulación de la hidrólisis enzimática de celulosa utilizando el software Berkeley Madonna **70**

Capítulo X.

Simulación de un proceso de fermentación en modalidad batch con aireación **77**

Capítulo XI.

Modelo matemático y estimación de parámetros cinéticos para un biorreactor Airlift de tubos concéntricos **84**

Área Temática:
Alimentos

Capítulo I.

Calidad de la dieta y variables relacionadas con la salud cardiovascular de adolescentes

Quality of diet and variables related to cardiovascular health in adolescents

Ricardo Terminel-Zaragoza,

Ana Rentería-Mexía,*

Gabriela Ulloa-Mercadoa,

Araceli Serna-Gutiérreza,

Pablo Gortares-Moroyoquia,

Denisse Serrano-Palacios

Instituto Tecnológico de Sonora,

**Autor de correspondencia: ana.renteria@itson.edu.mx*

Resumen

La dieta y el estilo de vida están relacionados con la salud cardiovascular desde la juventud. El objetivo fue analizar variables del estilo de vida y consumo de alimentos como indicadores de salud cardiovascular acorde a la AHA (Asociación Americana del Corazón), en adolescentes universitarios. Se evaluó antropometría e historia clínica, se aplicaron dos cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos validados contra el promedio de dos recordatorios de 24-horas. Se realizó chi-cuadrada y prueba t-test para muestras independientes por sexo, con significancia $p < 0.05$. Participaron 230 adolescentes (18 ± 0.5 años), 44.3% mujeres. Se encontró diferencia significativa entre sexos en peso, índice de masa corporal (IMC), circunferencia de cintura, grasa corporal, presión arterial y actividad física, así como en consumo de nueces y semillas, y carnes procesadas ($p < 0.05$). El consumo de alimentos relacionados con la salud cardiovascular en este grupo de población no cumplió con las recomendaciones ideales de la AHA.

Abstract

Diet and lifestyle have been associated with cardiovascular health since youth. The objective was to analyze lifestyle variables and food consumption as indicators of cardiovascular health according to the AHA (American Heart Association), in college adolescents. Anthropometry and medical history were evaluated, two validated food frequency questionnaires were applied against the mean of two 24-hour recalls. Chi-square and t-test were performed for independent samples by sex, with significance $p < 0.05$. Participants were $n=230$ adolescents (18 ± 0.5 years), 44.3% women. Significant difference was found between men and women in weight, body mass index (BMI), waist circumference, body fat,

blood pressure and physical activity, as well as in consumption of nuts and seeds, and processed meats ($p < 0.05$). The consumption of foods related to cardiovascular health in this group did not meet the ideal recommendations from the AHA.

PALABRAS CLAVE: calidad de la dieta, salud cardiovascular, adolescentes.

Introducción

En México, las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte, por lo que resulta de vital importancia monitorear los patrones de estilo de vida desde la adolescencia (Mendoza-Herrera et al., 2019). Sonora forma parte de la región Norte, donde se encuentra la prevalencia más alta de sobrepeso y obesidad en México (Shamah-Levy et al., 2019). Además, es uno de los estados con mayor tasa de eventos cardiovasculares anuales en el país (Campos-Nonato, et al., 2018; Barquera & White, 2018). Si bien las tasas de mortalidad por ECV suelen asociarse a factores de riesgo como la obesidad (central, principalmente), la alimentación también está involucrada debido a que la dieta del sonorense se caracteriza por un elevado consumo de carnes rojas, harina blanca, grasa saturada, azúcar y sal (Meléndez & Cañez, 2010).

Por esta razón y con el fin de reducir la morbilidad y mortalidad por ECV, la Asociación Americana para el Corazón (AHA, por sus siglas en inglés) estableció un concepto denominado “Salud Cardiovascular Ideal” (Steinberger et al., 2016), definido por la ausencia de enfermedad, y la presencia de 7 componentes, de los cuales 4 se relacionan con el estilo de vida: seguir las pautas dietéticas de reducción de grasa saturada, sodio, carne y carnes procesadas; no padecer sobrepeso u obesidad (tener IMC en rango normal > 18.5 y < 25 kg/m²); práctica habitual de actividad física; y evitar tabaquismo. Los otros 3 factores son biológicos: colesterol ≤ 200 mg/dL, presión arterial $\leq 120/\leq 80$ mmHg, y glucosa en ayunas ≤ 100 mg/dL.

Con la definición del concepto de salud cardiovascular ideal por la AHA, los hábitos de estilo de vida juegan un rol importante en la misma, y los adolescentes son un grupo vulnerable debido a que están expuestos a estilos de vida no saludables desde etapa temprana. A la fecha, no se han reportado estudios que evalúen la asociación de la dieta con la salud cardiovascular en adolescentes sonorenses.

El objetivo del estudio fue analizar variables del estilo de vida y consumo de alimentos y nutrimentos como indicadores de salud cardiovascular acorde al criterio de la AHA (Asociación Americana del Corazón) en adolescentes universitarios del Sur de Sonora.

Material y métodos

El presente estudio es transversal, con muestreo no probabilístico por conveniencia. El estudio se realizó en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON), Campus Náinari, Cd. Obregón, Sonora, durante Agosto-Diciembre 2018. Los criterios de inclusión fueron adolescentes menores de 20 años, de nuevo ingreso al ITSON. Los criterios de exclusión fueron: embarazo, presencia de enfermedad cardiometabólica como diabetes, hipertensión, etc., ser deportistas de alto rendimiento.

Se aplicaron historia clínica, cuestionario internacional de actividad física (IPAQ), cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) y recordatorios de 24-horas (24hR). Las encuestas dietarias se aplicaron por duplicado, con tres meses de distancia entre uno y otro, siguiendo los pasos de

la USDA (Blanton et al., 2006). Para medición antropométrica se siguió el protocolo internacional acorde al Anthropometric Standardization Reference Manual (Lohman et al., 1988). Todas las medidas se realizaron por triplicado. El peso y la grasa corporal se midieron con una báscula electrónica con impedancia eléctrica (Body Composition Scanner BC-533, marca TANITA), la talla con un estadímetro portátil (Modelo 213, marca SECA), la circunferencia de cintura con una cinta antropométrica estandarizada (marca Lufkin) y la presión arterial con un baumanómetro digital (marca OMRON). Se analizó la normalidad de los datos por las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y gráficas de kurtosis y sesgo, y las variables que no cumplieron con la distribución normal se transformaron matemáticamente. Se obtuvieron los promedios y desviación estándar para variables continuas, total y por sexo; para las variables categóricas se calcularon los porcentajes. Se realizó la prueba t-test para muestras independientes por sexo para las variables numéricas, y la Chi-cuadrada para las categóricas, con un nivel de significancia $p < 0.05$ (SPSS, versión 21.0, 2009, SPSS Inc, Chigado, IL).

Resultados y discusión

De 264 adolescentes, el 87.1% ($n=230$) fueron incluidos en este estudio, quienes completaron ambas administraciones del CFCA y del 24hR. La edad promedio fue 18.5 ± 0.4 años a la fecha de muestreo, 44.3% mujeres, en la Tabla 1 se muestran las variables relacionadas con la salud cardiovascular de los participantes del estudio. En ella se reportan los resultados de la evaluación antropométrica, composición corporal, actividad física y presión arterial. Los hombres presentaron mayor estatura y peso ($p < 0.001$), IMC ($p < 0.015$), circunferencia de cintura ($p < 0.001$) y presión arterial tanto sistólica como diastólica ($p < 0.001$ en ambas). Las mujeres presentaron mayor porcentaje de grasa corporal ($p < 0.001$), como era de esperarse por genética, y mayor actividad física en METs (equivalente metabólico por actividad) que los hombres ($p < 0.002$). Con base en el criterio de salud cardiovascular de la AHA, algunos de los resultados interesantes de este estudio son que la mayoría de los adolescentes cumplen con un criterio ideal para tabaquismo (90.9%), refiriendo no haber probado el tabaco o nunca haber fumado un cigarro entero. En promedio, los participantes tuvieron un nivel ideal para el percentil de IMC.

Tabla 1.

Variables antropométricas relacionadas con la salud cardiovascular de adolescentes universitarios, media (DE).

Variable	Total n=230	Femenino n=102	Masculino n=128	Valor de p*
Edad (años)	18.5 (0.4)	18.4 (0.4)	18.4 (0.3)	0.247
Peso (kg)	67.9 (16.5)	60 (15.3)	74.1 (14.7)	0.001
Altura (m)	1.7 (0.1)	1.6 (0.6)	1.7 (0.6)	0.001
Índice de Masa Corporal (IMC) (kg/m ²) **	23.9 (4.8)	23.3 (5.5)	24.3 (4.1)	0.015
Percentil IMC***	59.2 (30.8)	55.6 (31.1)	62 (30.4)	0.073
Circunferencia de cintura (cm)	77.3 (12.5)	72.3 (12.5)	81.1 (11.1)	0.001
Porcentaje de grasa (%)	21.5 (7.6)	25.6 (6.6)	18.1 (6.6)	0.001
Actividad Física (METs)	2167.4 (1876.2)	2515.9 (1885.5)	1739.5 (1782.3)	0.002

Presión Arterial (mmHg)				
Sistólica	113 (11.6)	107.2 (10.2)	117.6 (10.5)	0.001
Diastólica	71.9 (9.4)	69 (9.1)	74 (9.0)	0.001

*Prueba t-test para muestras independientes

**Se transformó a la inversa para t-test

***Se transformó por raíz cuadrada para t-test

En la Tabla 2 se presenta el consumo promedio reportado de los CFCA, organizados por grupos de alimento y nutrientes. Ambos sexos tuvieron un consumo similar en los grupos de frutas y verduras ($p=0.77$), y pescados y mariscos ($p=0.67$). Los hombres reportaron un consumo mayor no significativo que las mujeres en sodio de 464.5 mg/día ($p=0.23$) y bebidas azucaradas de 529.4 mL/semana ($p=0.52$). El promedio de consumo fue similar para ambos sexos respecto a granos enteros y grasa saturada (g/día, kcal/día y porcentaje) ($p>0.05$). El grupo de nueces y semillas (en conjunto) ($p=0.042$) y carnes procesadas ($p=0.002$) presentó un promedio de consumo significativamente mayor en hombres.

Tabla 2.

Consumo por grupos de alimentos de adolescentes universitarios, media (DE).

Variable	Total n=228	Femenino n=102	Masculino n=126	Valor de p*
Frutas y verduras (tazas/semana)	3.60 (2.2)	3.34 (0.7)	3.29 (0.7)	0.772
Pescados y mariscos (g/semana)**	507.4 (422.9)	501.7 (428)	513.1 (450.7)	0.671
Sodio (mg/día)**	2248.3 (1720.1)	1994 (1717.3)	2458.5 (1836.3)	0.239
Bebidas azucaradas (mL/semana)	3551.7 (2016.9)	3261.9 (1984.3)	3791.3 (2022.8)	0.52
Granos enteros (g/semana)	73.7 (42.8)	73.7 (39.6)	76.5 (42.5)	0.49
Nueces y semillas (g/semana)**	28 (17.5)	25.2 (17.2)	30.3 (17.2)	0.042
Legumbres (tazas/semana)**	1.06 (0.73)	0.99 (0.71)	1.12 (0.75)	0.133
Nueces, semillas y legumbres (porciones/semana)**	1.21 (0.71)	1.13 (0.71)	1.28 (0.70)	0.127

Carnes procesadas (g/semana)**	638.4 (527.6)	503.6 (300.3)	749.8 (639)	0.002
Grasa saturada (g/día)	17.5 (6.8)	17 (7)	17.8 (6.7)	0.369
Grasa saturada (kcal/día)	157.5 (61.8)	153.4 (63.2)	160.9 (60.7)	0.369
Grasa saturada (%/día)	10 (4.6)	10.6 (4.8)	9.5 (4.4)	0.129

*Prueba t-test para muestras independientes

**Valor transformado por raíz cuadrada

De los componentes del patrón de dieta saludable, seis grupos de alimentos se situaron en promedio en el nivel intermedio de alimentación saludable; pescados y mariscos en ideal; nueces y semillas, y carnes procesadas en nivel pobre.

En la ENSANUT (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición) 2018 se evaluaron varios grupos de alimentos, dentro de los que figuran la fruta con 35.2%, y verdura con 24.9%, en su consumo cotidiano entre adolescentes de 12 a 19 años, resultados mayores que el promedio de nuestra muestra. Esto en parte puede explicarse por el grado moderado y severo de inseguridad alimentaria en la zona urbana (19.6%) y rural (28.9%) (INEGI, 2018b). Otra posible explicación es el bajo porcentaje destinado al gasto para estos grupos de alimentos, acorde a la INEGI en 2018, las familias destinan un 13.9% mensual a la compra de frutas. Para las verduras, su porcentaje está combinado con legumbres, leguminosas y semillas, lo que vuelve difícil medirlo, y corresponde al 11.7% mensual (INEGI, 2018a). Otros estudios han reportado que en el Norte del país el porcentaje de energía que aportan las frutas y verduras a la dieta total es el más bajo de todos (Ortega-Avila, Papadaki, & Jago, 2019).

De los resultados de la ENSANUT 2012, dos estudios han analizado la ingesta de pescados y mariscos para la muestra de adolescentes: el primero de ellos por Gaona-Pineda et al., (2018), combinó este grupo con pollo, y reportó ingesta promedio de 18.4 g/día hombres, 20 g/día mujeres, y energía 34 kcal/día hombres, 36.9/d mujeres. El segundo, por Rodríguez et al., (2017) analizó la calidad de la dieta de los adolescentes por medio del Índice de Dieta Saludable (HEI; por sus siglas en inglés), donde obtuvieron un promedio de consumo de 3.2 de 5 para el grupo de pescados y mariscos. Comparando con nuestros resultados se demuestra que el consumo de pescados y mariscos es adecuado entre los adolescentes sonorenses comparado con la ingesta del promedio del país.

En estudios que incluían adolescentes mexicanos, el consumo total de granos enteros fue en promedio de 20 g/día en hombres y 24 g/día en mujeres, una cantidad mayor al promedio de nuestra muestra tanto para hombres como mujeres (Betancourt-Nuñez et al., 2018; Gaona-Pineda et al., 2018; Rodríguez et al., 2017). Sin embargo, la ingesta de granos enteros de nuestra muestra superó a la reportada en otros estudios en adolescentes mexicanos (Nieto et al., 2017). Una posible explicación es el consumo frecuente de tortillas de maíz, las cuales son componente de la dieta tradicional sonorenses (Sandoval Godoy et al., 2012).

Similar a otros estudios realizados en México, la ingesta de bebidas azucaradas en adolescentes se reporta muy alta. En 2012, la ingesta de estas bebidas fue de 497.8 mL/día, muy similar a nuestra muestra (Stern et al., 2014). En otro estudio, encontraron que en el Norte el porcentaje de energía proveniente del consumo de bebidas azucaradas era el más alto en el país (12.3%) (Ortega-Avila et al., 2019). En

México, en estudios previos en adultos se ha encontrado asociaciones entre el consumo de bebidas azucaradas y cereales refinados con el incremento del IMC, elevación de la presión arterial y glucosa en ayunas (Denova-Gutiérrez et al., 2010).

Conclusiones

Esta investigación contribuye de manera importante al estudio de la salud cardiovascular mediante la calidad de la dieta y estilo de vida de adolescentes del Norte de México. El presente estudio señala los grupos de alimentos y comportamientos más relacionados con el desarrollo de ECV, y que pueden necesitar una atención especial durante la implementación de intervenciones dietéticas. Los resultados encontrados enfatizan la importancia de la educación nutricional y promoción de estilos de vida saludables desde la adolescencia. A su vez, podrían dar pie a estudiar más de cerca la relación del consumo de ciertos grupos de alimentos con determinados factores de estilo de vida. Nuestros resultados exigen la necesidad de generar un entorno alimentario propicio para una dieta más saludable en los adolescentes del Sur de Sonora.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento del presente estudio por el Programa para el Desarrollo Profesional Docente con la beca PROMEP ITSON-EXB-109, y el Instituto Tecnológico de Sonora, beca PRO-FAPI_2018_0101. Así mismo, un agradecimiento especial a los participantes del estudio.

Referencias

- Barquera, S., Hernández-Barrera, L., Tolentino, M. L., Espinosa, J., Ng, S. W., Rivera, J. A., & Popkin, B. M. (2008). Energy Intake from Beverages Is Increasing among Mexican Adolescents and Adults. *The Journal of Nutrition*, 138(12), 2454–2461. <https://doi.org/10.3945/jn.108.092163>
- Betancourt-Nuñez, A., Márquez-Sandoval, F., González-Zapata, L. I., Babio, N., & Vizmanos, B. (2018). Unhealthy dietary patterns among healthcare professionals and students in Mexico. *BMC Public Health*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12889-018-6153-7>
- Blanton, C. A., Moshfegh, A. J., Baer, D. J., & Kretsch, M. J. (2006). The USDA automated multiple-pass method accurately estimates group total energy and nutrient intake. *Journal of Nutrition*, 136(10), 2594–2599. <https://doi.org/10.1093/jn/136.10.2594>
- Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza-Tobías, A., Medina, C., & Barquera, S. (2018). HTA en mexicanos. *Salud Pública de México*, 60(3), 233–243. <https://doi.org/10.21149/8813>
- Denova-Gutiérrez, E., Castañón, S., Talavera, J. O., Gallegos-Carrillo, K., Flores, M., Dosamantes-Carrasco, D., Salmerón, J. (2010). Dietary Patterns Are Associated with Metabolic Syndrome in an Urban Mexican Population. *The Journal of Nutrition*, 140(10), 1855–1863. <https://doi.org/10.3945/jn.110.122671>
- Gaona-Pineda, E. B., Mejía-Rodríguez, F., Cuevas-Nasu, L., Gómez-Acosta, L. M., Rangel-Baltazar, E., & Flores-Aldana, M. E. (2018). Dietary intake and adequacy of energy and nutrients in Mexican adolescents: Results from Ensanut 2012. *Salud Pública de México*, 60(4), 404–413. <https://doi.org/10.21149/8009>
- INEGI. (2018a). Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares. Retrieved from <https://www.inegi.org.mx/>

contenidos/programas/enigh/nc/2018/doc/enigh2018_ns_presentacion_resultados.pdf

- INEGI. (2018b). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018. Presentación de resultados. Retrieved from https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf
- Meléndez, J. M., & Cañez, G. M. (2010). Comportamiento alimentario y obesidad infantil en Sonora. In *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* (Vol. 8).
- Mendoza-Herrera, K., Pedroza-Tobías, A., Hernández-Alcaraz, C., Ávila-Burgos, L., Aguilar-Salinas, C. A., & Barquera, S. (2019). Attributable Burden and Expenditure of Cardiovascular Diseases and Associated Risk Factors in Mexico and other Selected Mega-Countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(20). <https://doi.org/10.3390/ijerph16204041>
- Nieto, C., Rincón-Gallardo Patiño, S., Tolentino-Mayo, L., Carriedo, A., & Barquera, S. (2017). Characterization of Breakfast Cereals Available in the Mexican Market: Sodium and Sugar Content. *Nutrients*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/nu9080884>
- Ortega-Avila, A. G., Papadaki, A., & Jago, R. (2019). The role of the home environment in sugar-sweetened beverage intake among northern Mexican adolescents: a qualitative study. *Journal of Public Health*, 27, 791–801. <https://doi.org/10.1007/s10389-018-0993-6>
- Rodríguez, L. A., Mundo-Rosas, V., Méndez-Gómez-Humarán, I., Pérez-Escamilla, R., & Shamah-Levy, T. (2017). Dietary quality and household food insecurity among Mexican children and adolescents. *Maternal and Child Nutrition*, 13(4), 1–12. <https://doi.org/10.1111/mcn.12372>
- Sandoval Godoy, S. A., & Gómez Camarena, M. D. (2012). Food consumption of the Sonoran population: tradition vs. internationalization. *Estudios Sociales*, 51–73.
- Shamah-Levy, T., Lucía Cuevas Nasu, Martín, R. V., Gaona-Pineda, E. B., Sánchez-Romero, L. M., & Rivera-Dommarco, J. A. (2019). INEGI. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018. ENSANUT. Diseño conceptual 2019.
- Steinberger, J., Daniels, S. R., Hagberg, N., Isasi, C. R., Kelly, A. S., Lloyd-Jones, D., ... Zachariah, J. P. (2016). Cardiovascular Health Promotion in Children: Challenges and Opportunities for 2020 and Beyond: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation*, 134(12), e236–e255. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000441>
- Stern, D., Piernas, C., Barquera, S., Rivera, J. A., & Popkin, B. M. (2014). Caloric beverages were major sources of energy among children and adults in Mexico, 1999–2012. *Journal of Nutrition*, 144(6), 949–956. <https://doi.org/10.3945/jn.114.190652>

Capítulo II.

Capacidad antioxidante de alimentos funcionales usando el ensayo del poder antioxidante reductor férrico (FRAP)

Antioxidant capacity of functional foods measured by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

¹Daniel Hernández Sierra,

¹Roberto Rodríguez Ramírez*,

²Luz Angélica Ávila Villa,

¹Alma Guadalupe Villa Lerma,

³Abraham Wall Medrano,

⁴Alejandro Cifuentes Gallego.

¹Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias. Instituto Tecnológico de Sonora.

²Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora.

³Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez – UACJ,

⁴Laboratory of Foodomics, Institute of Food Science Research (CIAL),

*Autor de correspondencia: roberto.rodriguez@itson.edu.mx

Resumen

Los alimentos funcionales se consideran como los alimentos que tienen un efecto potencialmente positivo en la salud más allá de la nutrición básica. Para probar estos efectos es necesaria la realización de estudios in vitro para la determinación de bioactividades. Por ello, el objetivo fue determinar la capacidad antioxidante en alimentos funcionales, mediante el ensayo del poder antioxidante reductor férrico (FRAP). Para la realización del ensayo se utilizó Trolox como estándar, cuya capacidad antioxidante equivalente fue evaluada en las mismas condiciones de trabajo que las muestras, presentando una alta linealidad. Para las muestras se encontraron concentraciones en un rango de 2162.5 – 49162.50 (en μM Trolox). Sin embargo, tres de las muestras no mostraron capacidad antioxidante. El ensayo nos ofreció una buena herramienta para medir la capacidad antioxidante en un alimento, dando como resultado una base científica con respecto a las funcionalidades que estos alimentos declaran.

Abstract

Functional foods are considered foods that have a potentially positive effect on health beyond basic

nutrition. To test these effects, it is necessary to carry out *in vitro* studies to determine bioactivities. Therefore, the objective was to determine the antioxidant capacity in functional foods by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. To carry out the assay, Trolox was used as a standard, whose equivalent antioxidant capacity was evaluated under the same working conditions as the samples, showing high linearity. Concentrations were found in a range of 2162.5 - 49162.50 (in μM Trolox) for the samples. However, three of the samples did not show antioxidant capacity. The assay offered us a good tool to measure the antioxidant capacity in food, resulting in a scientific basis regarding the functionalities that these foods declare.

PALABRAS CLAVE: Antioxidante, autenticidad, bioactividad, declaraciones

Introducción

Los alimentos funcionales se consideran como los alimentos que están destinados a ser consumidos como parte de la dieta normal y que contienen componentes que tienen un efecto potencialmente positivo en la salud más allá de la nutrición básica. Sin embargo, debido a la creciente demanda de alimentos y al aumento de la globalización del comercio, existe un mayor riesgo de que este tipo de alimentos no sean auténticos (Martirosyan y Singharaj, 2016; Pravst et al., 2018). Como los productos no auténticos son de interés económico y pueden tener riesgos para la salud, por esta razón y con el fin de luchar contra la adulteración y la falsificación de productos alimenticios, es un requisito la información completa y veraz sobre los productos alimenticios que se comercializan (Kamiloglu, 2019).

Dado el potencial interés de los alimentos funcionales para la salud pública, es de gran importancia que los consumidores tengan una clara comprensión de sus potenciales beneficios, y el nivel de confianza se fortalecerá en relación a la base científica que se utilice para documentar los efectos de salud y declaraciones. Hay evidencia que incluir este tipo de productos en la dieta es efectivo promotor para una buena salud y disminución de enfermedades (Küster-Boluda y Vidal-Capilla, 2017). Para probar los efectos beneficiosos de un alimento funcional es necesaria la realización de estudios *in vitro* para la determinación de la capacidad biológica (bioactividades) del producto. Por este motivo, para conseguir un verdadero éxito con estos alimentos es necesario que la información transmitida al consumidor corresponda a lo declarado en la etiqueta y basada en evidencias científicas (Granato et al., 2017; Pilar Callao y Ruisánchez, 2018).

Existen una gran cantidad de antioxidantes en los alimentos, especialmente si consideramos los alimentos provenientes de plantas. La importancia de la ingesta de alimentos ricos en antioxidantes es el beneficio que proporciona a la salud de las personas. Debido al valor de los antioxidantes, varios ensayos han sido propuestos para evaluar la capacidad antioxidante en alimentos, entre ellos, el ensayo del poder antioxidante reductor férrico (FRAP), el cual es relativamente simple, rápido, sensible y no tan caro para desarrollar. Es importante mencionar que el ensayo puede ser empleado para detectar adulteración de alimentos (Martins et al., 2013). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad antioxidante en alimentos funcionales disponibles en el mercado mediante el ensayo FRAP.

Material y métodos

Fueron adquiridos en supermercados locales y utilizados como muestras 15 productos comerciales denominados como alimentos funcionales, incluyendo aquellas que declaran algún ingrediente o poseer alguna bioactividad en su etiquetado.

Para la detección de la capacidad antioxidante se utilizó el ensayo FRAP de acuerdo a lo reportado por Benzie y Strain (1996). El reactivo FRAP fue preparado mezclando un buffer ácido acético-acetato de sodio (300mM) (pH 3.6), con 2, 4, 6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (10mM) disuelto en HCl (40mM) y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20mM) en una relación 10:1:1. Por cada 10 μl de muestra se tomaron 300 μl del reactivo FRAP de preparación reciente y 30 μl de agua desionizada, la mezcla fue dejada en la oscuridad por 8 min. Las mediciones de las muestras fueron realizadas en paralelo a un calibrador para generar la curva de referencia usando Trolox como patrón a una longitud de onda de 593 nm en un espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Scientific). La curva de calibración fue preparada utilizando soluciones estándar de Trolox en concentraciones 300 μM , 150 μM , 75 μM , 37.5 μM , 18.75 μM , 9.375 μM y 4.688 μM . Todas las muestras fueron llevadas a cabo por triplicado y los resultados se expresaron como μM Trolox.

Resultados y discusión

Para poder llevar a cabo la evaluación de la capacidad antioxidante por el ensayo FRAP, se realizó una curva de calibración, utilizando soluciones estándar de Trolox, el cual es un compuesto análogo de la vitamina E, que actúa como antioxidante (Figura 1). La ecuación obtenida ($y=0.0005+0.3003$) mediante la curva de Trolox mostró una alta linealidad para el ensayo, con un valor aceptable ($R^2=0.9996$) en un rango de concentraciones de 300 μM hasta 4.68 μM , con lo cual se obtuvieron los valores de las muestras comerciales analizadas.

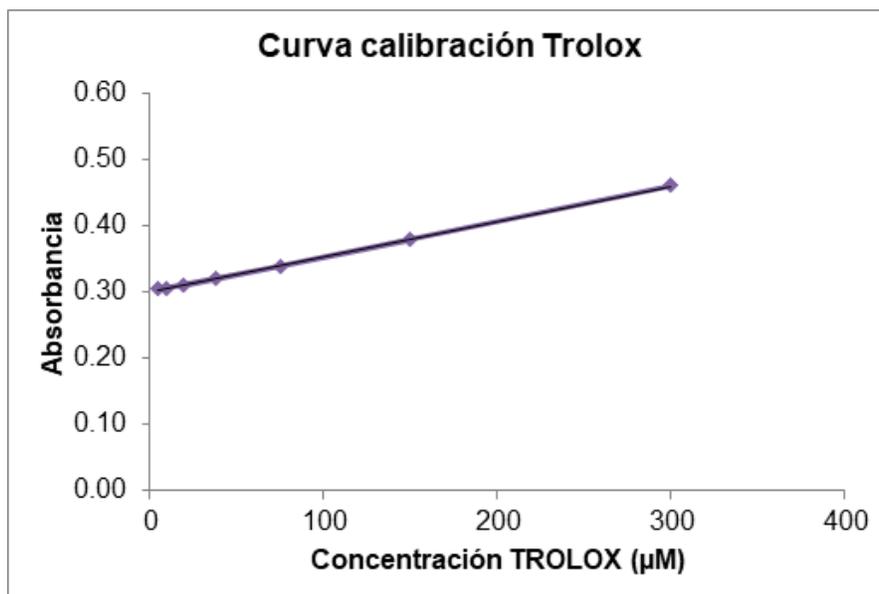


Figura 1. Curva de calibración de Trolox para ensayos FRAP. Diluciones seriadas de concentraciones conocidas (300 μM - 4.688 μM)

El ensayo FRAP evaluó la capacidad antioxidante de las muestras de acuerdo con su capacidad para reducir el Fe+3 presente en un complejo con TPTZ hasta la forma Fe+2. Los resultados encontrados nos muestran distintos valores del poder antioxidante reductor férrico. En el caso de las 15 muestras se obtuvieron valores en un rango de $2162.5 \pm 3.89 \mu\text{M}$ a $9162.50 \pm 6.62 \mu\text{M}$. Sin embargo, en tres de las muestras analizadas no se logró detectar la capacidad antioxidante utilizando el método FRAP (tabla 1). En este sentido, diferentes componentes antioxidantes de las muestras pueden actuar por distintos mecanismos dentro de la matriz y, por lo tanto, tener diferentes reacciones químicas que pueden resultar en distintos grados de capacidad antioxidante. Así pues, la capacidad depende esencialmente de la naturaleza de los antioxidantes y la matriz alimentaria (Correa et al., 2017).

Tabla 1.

Capacidad antioxidante FRAP de los productos comerciales. ND = No detectado; valores medios \pm desviación estándar (coeficiente de variación).

ALIMENTO	Concentración μM Trolox
Muestra 1	36150.0 ± 19.09 (2.64)
Muestra 2	6925.0 ± 3.94 (4.51)
Muestra 3	ND
Muestra 4	2162.5 ± 3.89 (8.99)
Muestra 5	7166.7 ± 6.66 (4.65)
Muestra 6	14925.0 ± 2.12 (0.71)
Muestra 7	30025.0 ± 9.19 (1.53)
Muestra 8	4162.5 ± 0.35 (0.42)
Muestra 9	3787.50 ± 5.30 (7.0)
Muestra 10	ND
Muestra 11	ND
Muestra 12	34325.0 ± 4.24 (0.62)
Muestra 13	14708.33 ± 8.81 (2.99)
Muestra 14	15200.0 ± 7.78 (2.56)
Muestra 15	49162.50 ± 6.62 (1.69)

Las muestras que presentaron mayor capacidad antioxidante fueron la 1 (bebida arándano), 12 (té) y 15 (jugo) con valores de 36150.0 ± 19.09 , 34325.0 ± 4.24 , 49162.50 ± 6.62 respectivamente. Esto concuerda de acuerdo a lo declarado en su etiquetado a que contiene antioxidantes en el alimento, donde estas fueron bebidas derivadas de frutos, y compuestos de algunas plantas reportadas previamente con actividad antioxidante (Baret et al., 2013, Huang et al., 2005).

En estudios anteriores se han reportado valores para diferentes muestras (jugo de frutas, té, vinos y

otras bebidas) en un rango de 1100–120000 μM , (Benzie & Choi, 2014; Martins et al., 2013). Entonces, estos valores concuerdan con los de este trabajo donde los valores de Trolox se encuentran dichos rangos para muestras similares como los jugos.

Conclusiones

Se logró determinar la capacidad antioxidante utilizando ensayos FRAP, y se encontró que algunos de los productos no presentan capacidad antioxidante a pesar de declararlo en su etiqueta. El ensayo utilizado nos ofreció una herramienta rápida, sencilla y flexible para medir la capacidad de los antioxidantes en un alimento, dando como resultado información que servirá como una base científica con respecto a las funcionalidades que estos alimentos declaran. Además, el ensayo FRAP se usa ampliamente en distintas partes del mundo, y ahora existe una base de datos de valores reportados en alimentos, bebidas, especias y hierbas, entre otros productos.

Referencias

- Baret, P., Septembre-Malaterrea, A., Rigoulet, M., Lefebvre d'Hellencourt, C., Priault, M., Gonthier, M., & Devin, A. (2013). Dietary polyphenols preconditioning protects 3T3-L1 preadipocytes from mitochondrial alterations induced by oxidative stress. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45, 167-174.
- Benzie, I.F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Benzie I. F.F., & Choi, S.W. (2014). Antioxidants in Food: Content, Measurement, Significance, Action, Cautions, Caveats, and Research Needs. *Advances in Food and Nutrition Research*, 71, 1-53.
- Correa, V.G., Gonçalves, G.A., Sá-Nakanishi, B.D., Ferreira, I.C.F., Barros, L., Dias, M.I., Koehnlein, E.A., Souza, C.G.M., Bracht, A., & Peralta, R.M. (2017). Effects of in vitro digestion and in vitro colonic fermentation on stability and functional properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) beverages. *Food Chemistry*, 237, 453-460.
- Granato, D., Sávio Nunes, D., & Barba, F.J. (2017). An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 13-22.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Kamiloglu, S. (2019). Authenticity and traceability in beverages. *Food Chemistry*, 277, 12-24.
- Küster-Boluda, I., & Vidal-Capilla, I. (2017). Consumer attitudes in the election of functional foods. *Spanish Journal of Marketing – ESIC*, 21, 65-79.
- Martins, A. C., Bukman, L., Vargas, A., M.M., Barizão, E. O., Moraes, J. C.G., Visentainer, J. V., & Almeida, V. C. (2013). The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system: Optimising the conditions using the response surface methodology. *Food Chemistry*, 138, 574-580.

Martirosyan D. M., & Singharaj B. (2016). Health Claims and Functional Food: The Future of Functional Foods under FDA and EFSA Regulation. *Functional Foods for Chronic Diseases*, 411-424.

Pilar Callao, M., & Ruisánchez, I. (2018). An overview of multivariate qualitative methods for food fraud detection. *Food Control*, 86, 283-293.

Pravst, I., Kušar, A., Žmitek, K., Miklavec, K., Lavriša, Ž., Lähteenmäki, L., Kulikovskaja, V., Malcolm, R. N., Hodgkins, C., & Raats, M. M. (2018). Recommendations for successful substantiation of new health claims in the European Union. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 259-263.

Capítulo III.

Diseño documental de programas prerrequisitos para el procesamiento de carne molida de ave

Documentary design of pre-requisite programs for processing ground poultry meat

*Elis Regina Rosales Chavarria *¹,
Esmeralda Mónica Peña González¹,
Francisco Héctor Chamorro Ramírez¹.*

*¹Laboratorio Veterinario de Ciencia de la Carne y Salud Pública, Departamento de Producción
Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco.*

Autor de correspondencia. Correo: reginagr295@gmail.com

Resumen

Los Programas Prerrequisitos (PPR) son un componente esencial para los establecimientos procesadores de alimentos y tienen como finalidad, evitar que los peligros de bajo riesgo se transformen en alto riesgo. El presente trabajo tuvo como objetivo el desarrollo documental de programas prerrequisitos para el procesamiento de carne molida de ave tomando como modelo el esquema de establecimiento Tipo Inspección Federal (TIF). Para lo anterior se tomaron como referencia las propuestas de formatos de PPR formulados por diversos autores y los PPR aplicables establecidos en el manual para la verificación de los prerrequisitos en establecimientos TIF. La revisión bibliográfica dio como resultado un formato integrado por 13 elementos, de estos, 4 estuvieron enfocados a identificar el documento, definir y especificar la finalidad del PPR, 2 con la finalidad de proveer una referencia conceptual, además de una referencia normativa, 6 enfocados al desarrollo, control y validación de las actividades de cada programa y finalmente una para sustentar la información contenida en los PPR. Es importante mencionar que dicho formato es único para este establecimiento y para PPR; ya que los documentos de autocontrol de los establecimientos (Procedimientos Operacionales Estandarizados de Saneamiento (POES), PPR, Análisis de Peligros y Puntos críticos de control (HACCP) se realizan en función de las necesidades, actividades y/o procesos de cada empresa, lo cual les confiere especificidad.

Abstract

The Prerequisite Programs (PRP) are an essential component for food processing establishments and have as their purpose, to prevent low-risk hazards from becoming high risk. The purpose of this work was the documentary development of prerequisite programs for the processing of ground poultry meat taking as a model the scheme of establishment Type Federal Inspection (TIF). For this were

taken as a reference the proposals of formats of PPRs formulated by various authors and the applicable PPRs established in the manual for the verification of the prerequisites in TIF establishments, the bibliographic review resulted in the integration of 13 elements in the format that was built. of these, 4 were focused on identifying the document, defining and specifying the purpose of the PPR, 2 in order to provide a conceptual reference, in addition to a normative reference, 6 focused on the development, control and validation of the activities of each program and finally one to support the information contained in the PPRs. It is important to mention that this format is unique for this establishment and for PPR; since the self-control documents of the establishments (Standardized Operational Procedures of Sanitation (SOPS), PRP, Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) are specific because they are carried out according to the needs, activities and / or processes of each company.

PALABRAS CLAVE: Control del proceso, contaminación cruzada, inocuidad de carne

Introducción

Se estima que la principal causa de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAS) y del deterioro de éstos se debe a la presencia o acción de microorganismos, lo que produce pérdidas económicas importantes en términos de gastos en salud, ausentismo laboral y pérdidas de alimentos que afectan sin distinción el nivel de desarrollo de los países. Menos frecuente, pero de igual importancia es la ocurrencia de riesgos originados por peligros de naturaleza física y química (Castro, 2015). La inocuidad de los alimentos es una responsabilidad ampliamente compartida entre todos los que componen la cadena agroalimentaria (Barclay, 2015). Por ello, recientemente se ha incrementado la demanda de alimentos seguros en cuanto a inocuidad y calidad por parte de los consumidores. El aseguramiento del cumplimiento de los requisitos legales para el producto es también un aspecto que toda organización perteneciente a la cadena alimentaria debe contemplar en su gestión (Castro, 2015).

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) son una herramienta básica para la obtención de productos seguros para el consumo humano, que se centralizan en la higiene y en la forma de manipulación y han sido definidas por la Organización Panamericana de la Salud como un método moderno para el control de las ETAS (Bastias et al., 2013). Otra de las herramientas básicas para la obtención de productos inocuos son los programas prerrequisitos (PPR), los cuales se definen como las prácticas y condiciones necesarias antes y a lo largo de la implementación del Sistema de HACCP y son esenciales para la inocuidad alimentaria; Los PPR consideran los peligros provenientes del entorno de trabajo, incluidos los producidos por contaminaciones cruzadas, a diferencia del Plan de HACCP el cual considera los peligros específicos del proceso de producción (Aragones et al., 2005). La implementación y la excelencia en el diseño apropiado, monitoreo, validación y mejoramiento continuo de los Programas Prerrequisito pueden contribuir en un alto porcentaje a prevenir y/o eliminar los peligros asociados con la inocuidad del alimento (Castro, 2015).

Material y Métodos

Para realizar el diagnóstico fue necesario visitar una planta en búsqueda de áreas de oportunidad identificando inconsistencias o necesidades de mejora en el proceso productivo, las instalaciones, el equipamiento y las prácticas del personal. Una vez hecho esto se procedió a la búsqueda de información

relacionada con el diseño de programas prerrequisitos, como el marco regulatorio nacional y las propuestas de PPR existentes elaboradas por diferentes autores y/u organizaciones, una vez seleccionada la información, esta se analizó y clasificó mediante fichas de trabajo y cuadros comparativos siguiendo una metodología establecida.

Finalmente, se procedió a la construcción de un formato para la elaboración de los programas prerrequisitos requeridos por el sistema TIF; este formato se bosquejó basándose en diseños preexistentes elaborados por Aragonés et al. (2005) y Castro (2015). La inclusión de las secciones contenidas en el formato se basó en un esquema de decisiones a partir de las siguientes preguntas guía ¿qué se va a controlar? ¿Para qué se va a controlar? ¿Quién lo va a controlar? ¿Dónde se va a controlar? ¿Cuándo se va a controlar? ¿Con qué se va a controlar? ¿Cómo se va a controlar? y ¿Cómo se va a verificar el control?

Resultados y discusión

El diagnóstico dio como resultado una lista de desviaciones presentes en diferentes niveles relacionados a la producción dentro del establecimiento (instalaciones, equipamiento, procesos y personal). A continuación, se muestran algunos de los resultados obtenidos durante el diagnóstico y los documentos que se elaboraron para la corrección y control de las desviaciones. (Tabla 1).

Tabla 1.

Necesidades detectadas en el establecimiento y acciones realizadas para su corrección.

Problemas	Necesidades
El establecimiento carece de documentos que establezcan los procesos que se realizan.	Elaboración de programas prerrequisitos.
El personal no cumple con sus obligaciones como manipuladores de alimentos.	Elaboración de los PPRs capacitación del personal y evaluación de la higiene y salud del personal.
Uso de ingredientes no declarados en las etiquetas de los productos.	Elaboración de los PPRs para el control de manejo de aditivos restringidos y alérgicos y etiquetado de productos.
Detección de insectos de las áreas de procesamiento de alimentos.	Diseño de un PPR para el control de fauna nociva.
Detección de óxido y desgaste en los equipos.	Elaboración de un PPR de mantenimiento preventivo y correctivo de equipos.
Se detectó la formación de escarcha dentro de las cámaras de refrigeración y altas temperaturas dentro de las áreas de procesamiento de alimentos.	Elaboración de un PPR para el control de temperaturas de refrigeración y congelación.

Se detectó la presencia de material de desecho dentro de las cámaras de almacenamiento de materia prima.	Elaboración del PPR control de desechos y materia extraña.
La materia prima no provenía de establecimientos certificados, además, no se cuenta con un documento que establezca condiciones de recepción.	Elaboración del PPR control de recepción y manejo de materia prima, empaques y embalajes.
Se identificó el uso inadecuado de los químicos de limpieza.	Elaboración de un PPR de control de químicos.
Se detectaron lecturas erróneas de los termómetros de tipo reloj de las cámaras de refrigeración y congelación.	Elaboración de un PPR de calibración de equipos.
Se detectó la presencia de lámparas fundidas en las áreas de inspección y de proceso.	Elaboración de un PPR de control de la iluminación.
El establecimiento no cuenta con un plan escrito de mantenimiento de instalaciones, además, cuando llega a realizarse el mantenimiento utilizan materiales inadecuados.	Elaboración de un PPR de mantenimiento preventivo y correctivo de las instalaciones.
El establecimiento no lleva un control de la trazabilidad de los productos y no cuenta con un programa de retroalimentación.	Diseño de un PPR de trazabilidad y recuperación de producto.
Se detectó el transporte inadecuado de los productos desde la planta a los puntos de venta.	Elaboración de un PPR para el control del procedimiento para el transporte de los productos.

El análisis de la información consultada y la revisión de formatos determinaron que cada PPR sería estructurado con 13 elementos (Tabla 2), los cuales representan la información mínima requerida en un PPR. Para realizar los formatos se tomaron en cuenta diferentes factores entre los que están la normativa nacional, los programas prerrequisitos requeridos por el Servicio Nacional de Seguridad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) para los establecimientos TIF y los PPR aplicables para el tipo las actividades productivas del establecimientos planteado en este proyecto. Cabe mencionar que dicho formato es único ya que fue construido a partir de información específica considerando las necesidades de un establecimiento que procesa carne molida de ave; de acuerdo con Aragonés et al. (2005), los prerrequisitos deben ser específicos para cada establecimiento, ya que cada uno necesita los propios de acuerdo con sus actividades y/o sus procesos particulares.

Tabla 2.

Elementos seleccionados para la conformación del formato de programas prerrequisitos.

Elemento	Función	Contenido
Encabezado	Identificación y clasificación del documento.	Logotipo de la empresa, logotipo TIF con número de establecimiento, título del PPR, versión, vigencia y código de entrada del manual de supervisión del sistema TIF.
Introducción	Explicar al lector la importancia del PPR y de su cumplimiento.	Información sobre la importancia del PPR en el procesamiento de los productos.
Objetivo	Definir que se quiere alcanzar y brindar una guía para el desarrollo del trabajo	
Alcance	Distinguir entre que incluir en el programa y que no	Áreas, equipos, utensilios, superficies, materiales, etc. relacionados con el PPR.
Definiciones	Aclarar o precisar el sentido de ciertas expresiones o palabras	Conceptos
Normatividad aplicable	Brindar una referencia sobre el marco regulatorio.	Se enlistaron los decretos gubernamentales y privados (de carácter obligatorio y/o no obligatorio).
Actividades generales	Definir las acciones que deben realizar los responsables de la ejecución de las actividades descritas en el PPR.	Mandatos relacionados al cumplimiento de las actividades del PPR.
Responsables	Definir a los encargados de llevar a cabo los procedimientos.	Nombres y cargos de empleados del establecimiento.
Actividades específicas	Definir las acciones relacionadas con el alcance y el objetivo, éstas deben verificarse.	Procedimientos que deben realizarse para controlar procesos relacionados al objetivo del PPR.
Monitoreo	Detectar incumplimientos en las actividades y/o determinar la eficacia de los programas	Aquí se incluyen los procedimientos que se realizan para supervisar que las actividades descritas en los PPR sean llevadas a cabo.
Verificación	Definir las metodologías que se emplearan para realizar las actividades descritas en el PPR.	Métodos y herramientas mediante los cuales se controlan las actividades.

Acciones correctivas	Definir las acciones a realizar en caso de que algunas disposiciones del programa no se lleven a cabo por fallas en los equipos, incumplimientos y/o en caso de detección de deficiencias en el programa.	Procedimientos a seguir en caso de que surja algún problema que impida el cumplimiento de las actividades establecidas.
Referencias	Respaldar el contenido teórico del PPR.	Fuentes bibliográficas que sean utilizadas para la elaboración del PPR (incluyendo normatividad).

Tomando en cuenta lo anterior se elaboraron 19 programas prerequisites, los cuales se agruparon en 4 categorías dentro de las BPM (Tabla 3).

Tabla 3.

Clasificación de los programas prerequisites de acuerdo con la función que cumplen

Categoría	Programas prerequisites incluidos	Expectativas
Control y mantenimiento de instalaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Mantenimiento preventivo y correctivo de instalaciones • Control de la condición sanitaria de los exteriores • Control de la iluminación • Control de la ventilación 	Se espera que los PPRs agrupados en esta categoría contribuyan al correcto funcionamiento del establecimiento y sus procesos, además de ayudar a prevenir el deterioro de las instalaciones.
Control y mantenimiento de equipos	<ul style="list-style-type: none"> • Mantenimiento Preventivo y correctivo de equipos • Calibración de equipos • Control de temperaturas de refrigeración y congelación • Control de temperaturas en esterilizadores y equipos que requieran calor para su funcionamiento 	Se espera que los PPRs agrupados en esta categoría ayuden a prevenir el deterioro de los equipos.

La Tabla continúa en la página siguiente

Control de proceso productivo	<ul style="list-style-type: none"> ● Trazabilidad y recuperación de producto ● Identificación, segregación y disposición de producto no conforme ● Identificación, segregación y disposición de producto no comestible ● Control de desechos y materia prima ● Control de recepción y manejo de materias primas, empaques y embalajes ● Control de productos químicos ● Manejo de aditivos restringidos y alérgenos ● Potabilidad del agua ● Control de fauna nociva 	Se espera que los PPRs agrupados en esta categoría ayuden a controlar el proceso productivo y a prevenir situaciones que favorezcan la contaminación de los alimentos.
Control de la salud, higiene y capacitación del personal	<ul style="list-style-type: none"> ● Capacitación del personal ● Evaluación de la higiene y salud del personal 	Se espera que los PPRs agrupados en esta categoría ayuden a promover la capacitación de los manipuladores de alimentos dentro del establecimiento.

La agrupación mostrada sirvió para desarrollar un mecanismo de gestión más eficiente, ya que nos permitió tener la información agrupada y a fácil acceso, debido a que cada carpeta se formó con PPR relacionados entre sí. De acuerdo con Aragonés et al. (2005) todos los documentos y registros deben ser accesibles para ser consultados por cualquier persona autorizada que requiera realizar una revisión. Por este motivo, deben mantenerse siempre ordenados y actualizados, sea cual sea el soporte documental en el que se encuentren, por esta razón se decidió que todos los PPR elaborados y sus respectivos formatos de control fueran archivados en una carpeta documental. En este trabajo se utilizó esta clasificación, sin embargo, cada establecimiento puede clasificar sus documentos de acuerdo con sus procesos y necesidades.

Conclusiones

Con el diagnóstico realizado al establecimiento se pudieron encontrar deficiencias, las cuales fueron consideradas como áreas de oportunidad que sirvieron para la elaboración de PPR.

La construcción de un marco de referencia para la elaboración de programas prerequisites aportó la información necesaria para elegir los elementos a incluir en dichos programas, a su vez, el diseño de los 13 elementos fue útil para estructurar toda la información dentro de los PPRs.

El agrupar los prerequisites dentro de cuatro categorías de las BPM ayudó a construir en forma precisa los prerequisites necesarios para un control integral del establecimiento.

Referencias

Área Temática: Alimentos

Aragonés Martín, Bargalló Mesones, Bigas Vidal, Blanco Rodríguez, Carrió Durich, Chacón Villanueva, Cugat Pujol, Duran Neira, Ferran Thió, Jacas Benages, Lloret Pujol, Marín Bosquet, Peña Guiu, Planes Magriñà, Portaña Tudela, Royo Santiago, Sala Estrada, Teixidó Canelles, Torrent Bosch, Tortadès Baucells, Yagüe Aylón. (2005). El autocontrol en los establecimientos alimentarios. Guía para el diseño y la aplicación de planes de prerrequisitos. 1era Ed. 89 -143. Barcelona: Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria.

Barclay, M. (2015) Guía de Buenas Prácticas de Manufactura en Panadería y Confitería. Tesis de maestría. Universidad Nacional de la Plata.

Bastías, J., Cuadra, M., Muñoz, O. & Quevedo, R. (2013). Correlación entre las buenas prácticas de manufactura y el cumplimiento de los criterios microbiológicos en la fabricación de helados en Chile. Revista Chilena de nutrición, 40(2), 161-168.

Castro, S. (2015) Diseño y elaboración de Tres Programas Prerrequisitos, en base a la norma ISO/TC 22002-1, en una planta Embotelladora de Bebidas Gaseosas, ubicada en Cuyotenango, Suchitepéquez. Tesis de maestría. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Capítulo IV.

Adición de oxitetraciclina en alimento para camarón y la acumulación máxima en músculo y hepatopáncreas

Addition of oxytetracycline in shrimp feed and the maximum accumulation in muscle and hepatopancreas

Sergio Gámez Bayardo¹,

Angelica Espinosa Plascencia¹,

Maribel Jiménez Edeza²,

María del Carmen Bermúdez Almada^{1}*

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Coordinación de Ciencia de los Alimentos. Laboratorio de Análisis Biológicos. .

²Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Ciencias Químico-Biológicas.

Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Microbiológico.

**Autor de correspondencia: cbermudez@ciad.mx*

Resumen

La inclusión de antibióticos en alimento para camarón para el tratamiento de enfermedades, puede incrementar los costos de producción, propiciando el uso de prácticas sin control de calidad. En este estudio se evaluaron dos procesos de adición de oxitetraciclina (OTC) a alimento para camarón, que fueron un método industrial (OTC1) y otro manual (OTC2) y se determinó la concentración máxima (C_{máx}) del antibiótico en músculo y hepatopáncreas. Estadísticamente se observó efecto en la C_{máx} en ambos tejidos respecto al tiempo de tratamiento (P=0.000) y al proceso de adición (P=0.001), obteniéndose una C_{máx} mayor en un 62 % para músculo y 23 % para hepatopáncreas, en el tratamiento OTC1 respecto a OTC2. Esto demostró que la adición del antibiótico al alimento sin control de calidad, afecta su acumulación en los tejidos, pudiendo provocar que no se alcancen las concentraciones suficientes en tejidos, para contrarrestar bacterias patógenas, representando un riesgo por el desarrollo de resistencia bacteriana.

Abstract

The inclusion of antibiotics in shrimp feed for the treatment of diseases could increase production costs, propitiating the use of practices without quality control. In this study, two processes of addition

of oxytetracycline (OTC) on the shrimp feed were evaluated: industrial process (OTC1) and manual (OTC2), and the maximum concentration (C_{max}) of the antibiotic in muscle and hepatopancreas was determined. Statistically, an effect was observed in the C_{max} in both tissues regarding to the treatment time ($P=0.000$) and the addition process ($P=0.001$), obtaining a greater C_{max} by 62 % for muscle and 23 % for hepatopancreas, in the treatment OTC1 versus OTC2. This showed that the addition of the antibiotic to the feed without quality control affects its accumulation in the tissues, causing that the sufficient concentrations in tissues are not reached, to counteract pathogenic bacteria, where it could represent a risk by the development of bacterial resistance.

PALABRAS CLAVE: Oxitetraciclina, alimento para camarón, acumulación, tejidos.

Introducción

En países con alta producción de camarón de cultivo *Penaeus vannamei*, el uso de antibióticos adicionados en el alimento sigue siendo una práctica común sin restricción (Lunestad et al., 2015). Información sobre el tipo y dosis de antibióticos utilizados en la acuicultura es escasa. En México, los antibióticos más utilizados, específicamente en el cultivo de camarón *P. vannamei* son, oxitetraciclina, florfenicol y enrofloxacin (Santiago et al., 2009). Estos antibióticos han mostrado su eficacia en el tratamiento de vibriosis y de infecciones causadas por bacterias con morfología de cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos (Soto-Rodríguez et al., 2008; Lara-Espinoza et al., 2015).

La administración de alimento para camarón adicionado con antibióticos incrementa los costos de producción en las granjas acuícolas (Nga et al., 2014). Esto ha propiciado que se utilicen procedimientos sin control de calidad para la adición de antibióticos en el alimento (Luu et al., 2021). Entre los procesos de adición más utilizados se encuentra el rociar el antibiótico en solución sobre el alimento comercial, o bien, mezclar un alimento comercial con el antibiótico en solución, agitándolo por corto tiempo; dichos procedimientos cuentan con poca estandarización y control además de que no garantizan una adecuada homogenización del fármaco (Davis et al., 2021), ni aseguran la concentración deseada del antibiótico en el alimento, previo a su aplicación en los estanques de cultivo (Li et al., 2021).

Es escasa la información existente relacionada con las prácticas de adición de antibióticos en las granjas acuícolas. Generalmente, los procedimientos utilizados para la adición de antibióticos, las condiciones de almacenamiento y el manejo de los alimentos medicados, se realizan en base a los criterios de los responsables técnicos de las granjas (Cabello et al., 2013). Es importante contar con información fundamentada que ponga de manifiesto las implicaciones que tiene el método de adicionar el antibiótico en el alimento, así como la acumulación que se alcanza en los tejidos de los organismos para contrarrestar infecciones bacterianas, como las ocasionadas por bacterias del género *Vibrio*, que son causantes de altas mortalidades en camarón de cultivo. Por ello, el objetivo de esta investigación fue evaluar dos procesos de adición de oxitetraciclina (OTC) al alimento para camarón y determinar la concentración máxima ($C_{máx}$) alcanzada del antibiótico en tejidos de camarón *Penaeus vannamei*.

Materiales y métodos

Aseguramiento de la calidad de los datos

El método utilizado para la cuantificación de OTC por cromatografía de líquidos de alta resolución

(HPLC) fue desarrollado tomando como base la metodología publicada por Bermúdez et al. (1999) y validado en un estudio previo de nuestro grupo de trabajo (Espinosa et al., 2012), con el propósito de establecer los parámetros de desempeño y compararlos con las especificaciones de validación de métodos analíticos (USDA, 1987). Los parámetros obtenidos en dicha validación fueron: linealidad, $r^2=0.9999$; límite de detección, $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$; límite de cuantificación, $0.05 \mu\text{g g}^{-1}$ y exactitud, $91.5 \pm 12.7 \%$ de recuperación para músculo y $90.1 \pm 17.3 \%$ para hepatopáncreas.

Alimento para camarón

Las muestras de alimento para camarón con y sin OTC se adquirieron en una empresa local fabricante de alimentos balanceados. El alimento con OTC declaraba en la etiqueta una concentración de 8000 mg Kg^{-1} . El alimento sin OTC se adicionó con el antibiótico de acuerdo al procedimiento indicado por la granja acuícola, el cual consistió en homogenizar 8 g de OTC pura en una solución de 250 mL de agua. Esta solución fue añadida a 1 kg del alimento y mezclada durante 15 min empleando una revolvedora mecánica (Cipsa Ultra 10) con motor Honda de 9 hp , para obtener una concentración de 8000 mg Kg^{-1} . Posteriormente, el alimento se colocó en una charola para secarlo y se cubrió con papel aluminio para protegerlo de la luz, una vez seco se administró a los organismos.

Ambos alimentos fueron preparados a una concentración teórica de 8000 mg Kg^{-1} de OTC. Se determinó la concentración de OTC en los alimentos previo a su administración a los organismos, siguiendo el procedimiento descrito por Houglum et al. (1997) y un método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). El análisis de las muestras de alimento se realizó por duplicado, incluyendo un control negativo (alimento sin antibióticos) y un control positivo (alimento con OTC a una concentración conocida).

Bioensayo experimental

Se realizó un bioensayo durante 30 días en una granja acuícola ubicada en Bahía de Kino, Sonora, México ($28^{\circ}48'57.1''\text{N } 111^{\circ}54'32.6''\text{W}$). Se emplearon 180 camarones juveniles de la especie *P. vannamei*, obtenidos de los estanques de la granja acuícola, los cuales se distribuyeron al azar en peceras de 40 L , colocando 20 organismos en cada pecera mantenidas con aireación constante durante todo el bioensayo. Se conformaron tres grupos de 60 organismos cada uno, identificándolos como OTC1, OTC2 y el grupo control como COTC. Se registró el peso y talla inicial de los camarones, que fue de $3.37 \pm 1.36 \text{ g}$ y $66.68 \pm 7.86 \text{ mm}$ para el grupo OTC1; $3.36 \pm 1.09 \text{ g}$ y $66.88 \pm 6.93 \text{ mm}$ para OTC2 y $3.59 \pm 1.22 \text{ g}$ y $68.45 \pm 7.07 \text{ mm}$ para el grupo COTC respectivamente.

Los camarones se aclimataron durante seis días, recibiendo durante ese período alimento sin antibióticos. Posteriormente, se inició la aplicación de los tratamientos durante 14 días . El grupo OTC1 correspondió a los organismos tratados con el alimento adicionado con OTC a través del proceso industrial, en la fábrica de alimentos balanceados, y el grupo OTC2 representó a los camarones tratados con alimento comercial sin OTC que fue adicionado con el antibiótico de acuerdo al protocolo establecido en la granja acuícola. El grupo COTC recibió alimento sin OTC.

Al finalizar la aplicación de los tratamientos, todos los organismos recibieron alimento sin antibiótico durante 10 días . La tasa de alimentación fue al 4% de la biomasa, y se administró 30% del alimento por la mañana, 30% en la tarde y 40% en la noche, de acuerdo al protocolo de alimentación de la granja acuícola.

Toma de muestras

Se tomaron muestras cada tercer día durante la realización del bioensayo, colectando seis organismos de cada grupo en cada muestreo. Se disectó asépticamente el hepatopáncreas y el músculo de cada organismo, y se almacenaron en congelación a -20°C hasta su análisis.

Determinación de oxitetraciclina en tejidos de camarón

Para la extracción y determinación de OTC en músculo y hepatopáncreas de camarón se siguió la metodología reportada por Gómez-Jiménez et al. (2008). El análisis estadístico de los datos se realizó a través del software Minitab 19.0.

Resultados y discusión

Determinación de oxitetraciclina en alimento

La concentración del antibiótico determinada analíticamente en el alimento OTC1 fue de $4684.38\text{ mg kg}^{-1}$ y para OTC2 de 776.81 mg kg^{-1} . La diferencia en la concentración teórica que fue de 8000 mg kg^{-1} , y la obtenida analíticamente del antibiótico en ambos alimentos, demostró que los procedimientos de adición no fueron adecuados, siendo más deficiente el proceso de adición empleado en la granja, ya que en este caso se obtuvo el 9.71 % de la concentración teórica de OTC. Mientras que en el alimento preparado industrialmente, la concentración de OTC determinada analíticamente correspondió al 58.56 % del nivel teórico calculado. Se confirmó la ausencia de OTC en el alimento comercial libre de antibióticos.

Si se considera que el alimento representa entre el 50 y 70 % de los costos de producción en el cultivo de camarón, es importante asegurar que éste sea lo más eficiente posible (Faillace et al., 2016). Por lo que se debe confirmar la concentración del antibiótico en el alimento antes de que éste sea administrado a los organismos en cultivo.

Acumulación de oxitetraciclina en tejidos de camarón

La acumulación de OTC en los tejidos de camarón después del primer día de tratamiento fue, para el grupo OTC1 de $2.02 \pm 0.35\ \mu\text{g g}^{-1}$ en músculo y $9.63 \pm 6.41\ \mu\text{g g}^{-1}$ en hepatopáncreas; para el grupo OTC2 fue de 0.57 ± 0.08 y $5.21 \pm 1.09\ \mu\text{g g}^{-1}$, en músculo y hepatopáncreas respectivamente. En el grupo OTC1, a los seis días de tratamiento se registró la $C_{\text{máx}}$, con un valor de OTC de $17.08 \pm 1.10\ \mu\text{g g}^{-1}$ en músculo y en hepatopáncreas se alcanzó a los nueve días, con un nivel de $122.03 \pm 29.71\ \mu\text{g g}^{-1}$. En tanto que en el grupo OTC2, la $C_{\text{máx}}$ se alcanzó a los 11 días en músculo, con una concentración de $6.50 \pm 0.29\ \mu\text{g g}^{-1}$ y en hepatopáncreas se obtuvo a los nueve días con un nivel de $93.90 \pm 10.4\ \mu\text{g g}^{-1}$.

Autores como Ma et al. (2019) evaluaron la acumulación de OTC en tejidos de camarón y en hemolinfa, encontrando una $C_{\text{máx}}$ de $1.67\ \mu\text{g g}^{-1}$ para músculo y de $124.34\ \mu\text{g g}^{-1}$ para hepatopáncreas. Estos resultados se asemejan con los encontrados en nuestro trabajo en función a la $C_{\text{máx}}$ obtenida en hepatopáncreas, demostrando que la farmacocinética en nuestro estudio fue adecuada. Por otra parte, Avunje et al. (2021) evaluaron la acumulación y eliminación de oxitetraciclina en tejidos de camarón *Penaeus vannamei*, encontrando que se requieren al menos siete días de administración de tratamiento para alcanzar la $C_{\text{máx}}$ del antibiótico en los tejidos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en

esta investigación al administrar una dieta con antibiótico con altos estándares de calidad, en donde se alcanzó la $C_{m\acute{a}x}$ a los seis días de administración del tratamiento. El comportamiento de la acumulación de OTC en los distintos tejidos se observa en la Figura 1.

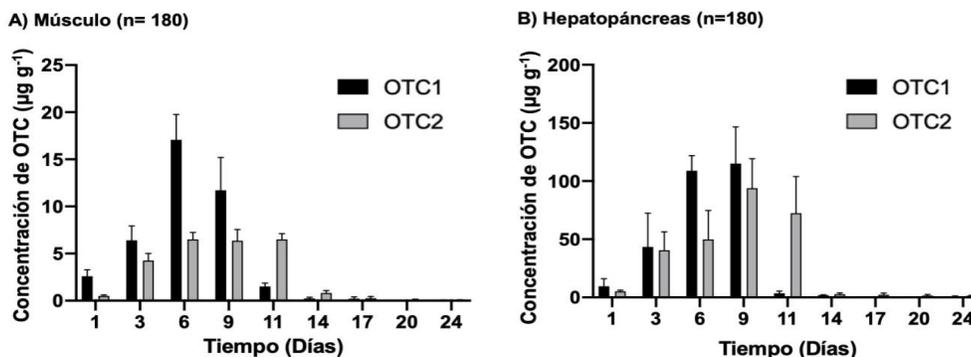


Figura 1. Comportamiento de la acumulación de OTC en tejidos de camarón *Penaeus vannamei*. A) Músculo, B) Hepatopáncreas.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente, observando un efecto en la $C_{m\acute{a}x}$ alcanzada en ambos tejidos con relación al tiempo transcurrido durante el bioensayo ($P=0.000$) y al procedimiento de adición de OTC al alimento para camarón ($P=0.001$), obteniéndose en el grupo OTC1 que recibió el alimento medicado industrialmente, una $C_{m\acute{a}x}$ 62 % mayor en músculo y 23 % en hepatopáncreas, comparada con la encontrada en el grupo OTC2, que recibió el alimento adicionado con OTC en la granja. Esta diferencia en la concentración de OTC en los alimentos tuvo un efecto significativo en la $C_{m\acute{a}x}$ alcanzada en músculo y hepatopáncreas, demostrando que la adición del antibiótico al alimento sin un control de calidad adecuado, afectó la acumulación en los tejidos. Esto puede provocar que no se alcance la concentración necesaria en los tejidos de los organismos, principalmente en hepatopáncreas, que es el órgano que se ve afectado en la mayoría de las infecciones bacterianas en camarón, y por lo tanto, no se pueda contrarrestar al agente patógeno causante de una infección.

Estudios previos han evaluado la acumulación de OTC en músculo y hepatopáncreas de camarón (Gómez-Jiménez et al., 2008; Bermúdez-Almada et al., 2014), señalando que la acumulación del antibiótico en los tejidos depende de diversos factores bióticos (factores propios de la farmacocinética de OTC como sitio activo, dosis administrada, ruta que toma el antibiótico para actuar y el periodo de exposición) y abióticos (salinidad, pH, temperatura y calidad del agua de los estanques). Aunado a esto, investigaciones relacionadas con la $C_{m\acute{a}x}$ alcanzada en los tejidos de camarón, han demostrado que ésta depende de la pureza del antibiótico, del proceso de adición del antibiótico al alimento y de la efectividad del mecanismo de acción del mismo (Ma et al., 2019). Por otra parte, autores como Avunje et al. (2021) determinaron que la concentración mínima inhibitoria (CMI) para especies de *Vibrio* expuestas a OTC fue de $1.96 \pm 0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$. En nuestro estudio las $C_{m\acute{a}x}$ alcanzadas con

ambos alimentos medicados fueron cercanas a esa CMI. Sin embargo, dichas concentraciones pueden ser insuficientes para contrarrestar la presencia de bacterias patógenas que han desarrollado una alta resistencia a oxitetraciclina.

Se observó que al finalizar el bioensayo (día 30), la residualidad de OTC en los tejidos de los organismos, fue de $0.04 \pm 0.02 \mu\text{g g}^{-1}$ en músculo y $0.34 \pm 0.12 \mu\text{g g}^{-1}$ en hepatopáncreas en el grupo OTC1, y para el caso del grupo OTC2, de 0.06 ± 0.02 y $1.65 \pm 0.18 \mu\text{g g}^{-1}$ en músculo y hepatopáncreas respectivamente. Cabe resaltar que para el caso de músculo, que es el tejido comestible, en ambos tratamientos se tuvo al finalizar el ensayo, una concentración por debajo de los límites máximos establecidos por el Departamento de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA) ($0.2 \mu\text{g g}^{-1}$), y por la Unión Europea ($0.1 \mu\text{g g}^{-1}$). Aspecto de gran importancia, ya que niveles por encima de los límites máximos permitidos, pueden repercutir en el rechazo del producto en los mercados, con las consecuentes implicaciones económicas y comerciales.

Conclusiones

Los procesos de adición de OTC al alimento para camarón que se evaluaron mostraron una falta de control de calidad, ya que los niveles de concentración detectados en ambos alimentos estuvieron por debajo de la concentración teórica establecida; siendo menor en el alimento obtenido bajo el proceso de adición en la granja acuícola, donde se obtuvo el 9.71% de la concentración teórica de OTC; mientras que en el alimento preparado industrialmente, la concentración de OTC determinada analíticamente correspondió al 58.56% del nivel teórico establecido.

La acumulación máxima de OTC en músculo y hepatopáncreas de camarón fue mayor en el grupo tratado con el alimento adicionado con el antibiótico de forma industrial, respecto al adicionado manualmente. Aun cuando las $C_{\text{máx}}$ alcanzadas en los tejidos de camarón fueron cercanas a las CMI reportadas, pueden ser insuficientes para contrarrestar la presencia de bacterias patógenas que han desarrollado una alta resistencia a oxitetraciclina. Por ello, es importante asegurar el control de calidad en la adición de antibióticos en alimento para camarón, ya que su aplicación en cantidades subterapéuticas puede provocar el desarrollo de resistencia bacteriana en los sistemas de cultivo.

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca al MC Sergio Gámez Bayardo. Además, se agradecen las facilidades otorgadas por la granja acuícola para la realización de esta investigación, especialmente al Biol. Adolfo Pérez Álvarez por su apoyo técnico.

Referencias

- Avunje, S., Patil, P. K., Ezas, W., Praveena, E., Ray, A., Viswanathan, B., Alavandi, S. V., Puthiyedathu, S. K. & Vijayan, K. K. (2021). Effect of oxytetracycline on the biosafety, gut microbial diversity, immune gene expression and withdrawal period in Pacific whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 543: 736957.
- Bermúdez-Almada, M. C., Espinosa-Plascencia, A., Santiago-Hernández, M. L., Barajas-Borgo, C. J. & Acedo-Félix, E. (2014). Comportamiento de oxitetraciclina en camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* y la sensibilidad a tres antibióticos de bacterias de *Vibrio* aisladas de los organismos. *Revista Biotecnología*, 16(3):29-37.

- Bermúdez-Almada, M.C., Pérez-Tello, M.G., Valenzuela-Quintanar, A.I. & Vázquez-Moreno, L. (1999). Oxytetracycline residues in cultured white shrimp tissue by HPLC and a microbial receptor assay. *Journal of Food Science*, 64(4):638-940.
- Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Tomova, A., Ivanova, L., Dolz, H., Millanao, A. & Buschmann, A.H. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*. 15, 1917–1942.
- Davis, R., Abebe, A., Boyd, C. & Mcnevin, A. (2021). Exploring the relationship between production intensity and land use: A meta-analytic approach with shrimp aquaculture. *Journal of Environmental Management*. 300: 113719.
- Espinosa-Plascencia, A., López-Arwayo, P. J., González-Carrillo, H. H. & Bermúdez-Almada, M. C. (2012). Efecto del congelado y cocinado sobre residuos de oxitetraciclina en camarón de cultivo. *Revista Biotecnia*, 8(3):12-21.
- Faillace, B.J. F., Vergara R. & Suarez A. (2016). Evaluación de una fórmula alimenticia para camarón de cultivo (*L. vannamei*) con inclusión de proteína vegetal a base de harina de soya. *Revista AquaTIC*, 44:12-29.
- Gómez-Jiménez, S., Espinosa-Plascencia, A., Valenzuela-Villa, F. & Bermúdez-Almada, M. C. (2008). Oxytetracycline (OTC) accumulation and elimination in hemolymph muscle and hepatopancreas of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following an OTC-feed therapeutic treatment. *Aquaculture*, 274:24-29.
- Houglum, J., Larson, R. & Knutson, A. (1997). Assay of chlortetracycline in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Association of Official Analytical Chemistry International*, 80(5):961- 965.
- Lara-Espinoza, C. L., Espinosa-Plascencia, A., Rivera-Domínguez, M., Astorga-Cienfuegos, K. R. & Acedo-Félix, E. (2015). Desarrollo de camarón *Litopenaeus vannamei* en un sistema de cultivo intensivo con biofloc y nulo recambio de agua. *Revista AquaTIC*, 43:1-13.
- Li, F., Huang, J., Wang, M., Chen, L. & Xiao, Y. (2021). Sources, distribution, and dynamics of antibiotics in *Litopenaeus vannamei* farming environment. *Aquaculture*. 545: 737200.
- Lunestad, B. T., Hannisdal, R. & Samuelsen, O. (2015). Safety of medical feed additives in the food chain. *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. United Kingdom. Woodhead Publishing. Chap.10 pp. 251-268.
- Luu, Q. H., Nguyen, T. B. T., Nguyen, T. L. A., Do, T. T. T., Dao, T. H. T. & Pawin, P. (2020). Antibiotics use in fish and shrimp farms in Vietnam. *Aquaculture Reports*. 20: 100711.
- Ma, R., Wang, Y., Zou, X., Fu, G., Li, C., Fan, P. & Fang, W. (2019). Pharmacokinetics of oxytetracycline in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, after oral administration of a single-dose and multiple-doses. *Aquaculture*, 512:734348.
- Nga, D. T. T., Chuc, N. T. K., Hoa, N. P., Hoa, N. Q., Nguyen, N. T. T., Loan, H. T., Toan, T. K., Phuc, H. D., Horby, P., Van Yen, N. & Van Kinh, N. (2014). Antibiotic sales in rural and urban pharmacies in northern Vietnam: an observational study. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 15, 6.
- Santiago, H. M. L., Espinosa, P. A. & Bermúdez, A. C. (2009). Uso de antibióticos en el cultivo de camarón. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(3):22-32.

Área Temática: Alimentos

Soto-Rodríguez, S. A., Gómez-Gil, B., Roque, A. & Lozano, R. (2008). MIC'S de antibióticos de *Vibrio* spp aislados de *L. vannamei* cultivado en México. *Panorama Acuícola Magazine*, Nov-Dic. pp. 53-56.

USDA, (1987). Food Safety and Inspection Service. Determining Acceptability of Methods for Regulatory Purpose (2.2.3). Chemistry Laboratory Quality

Assurance Handbook. Vol II. United States. Department of Agriculture, Beltsville, MD. USA.

Capítulo V.

Expresión relativa del gen Decorina de Bovinos y su relación con dureza de la carne

Relative expression of the Bovine Decorin gene and its relationship with meat hardness

**Suzette Juárez Contreras¹,*

Francisco Héctor Chamorro Ramírez¹,

José Alfredo Martínez Quintana² y

Brenda Margarita Quintana Gallegos²,

¹Laboratorio Veterinario de Ciencia de la Carne y Salud Pública. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

²Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Zootecnia y Ecología.

Universidad Autónoma de Chihuahua.

**Autor de correspondencia: sjcontreras.sc@gmail.com*

Resumen

El gen de la decorina (DCN) está relacionado con la ternura de la carne. El objetivo del estudio fue medir la expresión relativa del gen de la DCN en el músculo Longissimus dorsi de siete bovinos (hembras) de 23 meses de edad, de dos grupos raciales (Piedmontese x Hereford x Angus, y Piedmontese x Angus x Criollo) y relacionarlo con la dureza de la carne. Se midió el esfuerzo al corte en un texturómetro mediante Warner Bratzler; se realizó PCR para identificar el gen DCN y PCR cuantitativa (qPCR) para medir su expresión, utilizando Beta actina (β -Act) como gen de referencia; la expresión de DCN se reporta según el método $2^{-\Delta Ct}$ de Livak y Schmittgen; las muestras se analizaron estadísticamente, por grupo racial con una prueba t de student, utilizando el software estadístico SAS. No se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en la expresión de DCN entre grupos raciales, aunque hubo mayor ternura en PxAxC ($P < 0.05$). A pesar de no existir relación entre la expresión de DCN y la ternura de la carne, es importante buscar polimorfismos simples de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) que puedan afectar la función de la proteína.

Abstract

The decorin gene (DCN) is related to the tenderness of meat. The aim of the study was to measure the relative expression of the DCN gene in the Longissimus dorsi muscle of seven cattle (females) of 23 months of age, of two breed groups (Piedmontese x Hereford x Angus, and Piedmontese x Angus x

Criollo) and to relate it to the hardness of the meat. Shear stress was measured in a texturometer using Warner Bratzler; PCR was performed to identify the DCN gene and Quantitative PCR (qPCR) to measure its expression, using Beta actin (β -Act) as a reference gene; the expression of DCN is reported according to the 2- Δ Ct method of Livak and Schmittgen; the samples were analyzed statistically, by racial group with a student t test, using the statistical software SAS. No significant difference was found ($p > 0.05$) in DCN expression between breed groups, although there was greater tenderness in PxAxC ($P < 0.05$). Although there is no relationship between DCN expression and meat tenderness, it is important to look for simple single nucleotide polymorphisms (SNP) that may affect protein function.

PALABRAS CLAVE: Textura de la carne, Expresión genética, Proteoglicano, Calidad de la carne.

Introducción

La terneza es la facilidad o dificultad con la cual la carne se puede cortar o masticar (Gómez, 2016). Se considera como el factor más importante para determinar la satisfacción del consumidor y es uno de los criterios de selección más relevante al comprar carne (Desgarenes, Del Moral, Meza, Peña, Zárata y Abad, 2017), siendo necesario disponer de bovinos genéticamente capaces de producir carne con terneza aceptable por los consumidores. La terneza no es verificable hasta después del sacrificio (Nishimura, 2015), por lo que es importante buscar otras opciones para identificar la calidad. Recientemente, con la genómica, existe evidencia de algunos genes que afectan la terneza de la carne, lo que permite la identificación de marcadores genéticos con fines de mejoramiento de la calidad de carne bovina (Pinilla, 2014). Actualmente, existe gran interés en las pruebas moleculares para encontrar variantes favorables en la terneza de la carne. Los SNP pueden ser importantes marcadores que indican cambios en el DNA, específicamente con la sustitución de un sólo nucleótido por otro, deleciones o inserciones que se identifican al ser comparados con genomas de individuos de la misma especie (Molano, 2016). Los proteoglicanos (PG) son componentes de la matriz extracelular entre los que destaca la DCN, que es un PG pequeño de 37 kDa de peso molecular en bovinos (Pinilla, 2014). Se ha reportado como un gen relacionado con la miogénesis y terneza: puede ligarse a más de dos fibrillas de colágeno influyendo en la dureza de la carne (Nishimura, 2015), promueve la regeneración en el músculo esquelético y acelera la cicatrización después de la lesión; se ha demostrado que la expresión de DCN se relaciona con la expresión de colágeno tipo I, y que en los músculos de bovinos que han presentado mayor expresión de DCN, han mostrado mayor dureza (Pinilla, 2014). Por ello, es importante generar más información sobre la presencia de SNP en el gen de la DCN que puedan afectar su expresión o función en bovinos de carne, impactando en características de importancia económica.

El objetivo de esta investigación fue medir la expresión de DCN en músculo de bovinos de dos grupos raciales y analizar su relación con la dureza de la carne.

Materiales y métodos

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Se empleó RNA del músculo Longissimus dorsi de siete hembras de 23 meses de edad, tres F1 Angus x Criollo de Chihuahua (AxC) y cuatro Hereford x Angus (HxA), todas hijas de padre Piedmontese. El RNA fue extraído con el reactivo TRI-

zol™ (Invitrogen™) siguiendo las instrucciones del fabricante, fue cuantificado en un espectrómetro Nanodrop 2000 (Termo Fisher Scientific) y su integridad fue verificada por electroforesis en gel de agarosa (1%). A partir de 1 µg de RNA total se sintetizó DNA complementario (cDNA) mediante PCR transcripción reversa (RT-PCR) con el kit PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (Takara) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó PCR a partir del cDNA, utilizando los primers forward 5'ATGAAGGCAACTATCATCTTTC3' y reverse 5'GTTTCAGCTTGAAACTACAAG3', para amplificar la secuencia codificante de DCN (1080 pares de bases (pb)). La reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 25 µL (5 µL de Green or colorless Gotaq Flexi Buffer 5X, 0.5 µL de dNTP's a 10 mM, 2.5 µL de MgCl₂ a 25 mM, 1.0 µL de cada primer a 10 µM, 0.2 µL de GoTaq® DNA polymerase (Promega), 1.5 de µL de cDNA y 13.3 µL de agua libre de nucleasas).

La reacción de PCR punto final fue realizada en un termociclador (Mastercycler® Nexus, Eppendorf) con las siguientes condiciones: desnaturalización a 95° C por 2 minutos; 35 ciclos de 20 s a 95° C; 20 s a 53° C; 80 s a 72° C; extensión final de 7 min a 72° C, y enfriamiento a 4° C. Los productos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (1.5%) con bromuro de etidio y se utilizó un marcador molecular de DNA (EZ Load™ 100 bp, BIO-RAD). Los geles se observaron en un transiluminador BioDoc-Itm Imaging System benchtop 2UV. El producto restante de PCR fue colocado en viales para su posterior secuenciación en el Laboratorio de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Para medir la expresión por PCR cuantitativa (qPCR), se diseñaron primers para DCN y Beta actina (β-Act), utilizando este último como gen de referencia. La reacción se realizó en un termociclador (Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR system Thermal Cycling Block), en un volumen final de 20 µL (10 µL de PowerUp™SYBR™Green Master Mix 2X, 0.35 µL de cada primer a 10 µM, 8.3 µL de agua libre de nucleasas, y 1 µL de cDNA (proveniente de 12.5 ng de ARN total). Para cada corrida de qPCR se utilizó una curva estándar de cinco puntos, generada a partir de diluciones 1:3 de cDNA. Con las siguientes condiciones: 50° C por 2 min (1 ciclo); 95° C por 2 min (1 ciclo) y 40 ciclos de 95° C por 15 s; 58° C por 15 s y 72° C por 40 s. Se utilizó un programa de curva de disociación que parte de 60° C hasta 95° C, aumentando 0.5° C en cada ciclo de 5 s. La expresión de DCN se reporta en relación con la expresión de β-act de siete muestras de cDNA, un control negativo y los cinco puntos de la curva, con dos réplicas técnicas cada una, utilizando el método 2- ΔCt de Livak y Schmittgen.

Las muestras de carne de los siete animales analizados fueron sometidas a maduración (15 días), cocción (71° C) y enfriamiento (24 h). Se determinó su esfuerzo al corte mediante cizallamiento con Warner Bratzler, en un texturómetro a una velocidad de 20 cm/min. Para identificar la relación entre la expresión de DCN y esfuerzo al corte, se analizó estadísticamente mediante el modelo: $Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$, donde Y es la variable dependiente y representa el esfuerzo al corte y la expresión génica de DCN; μ es la media; G_i corresponde al i-ésimo grupo racial; y e representa el j-ésimo error experimental del i-ésimo grupo racial. Las muestras se analizaron por grupos raciales (PxAxC y PxHxA), y la comparación se realizó con una prueba t de Student (con un $\alpha \leq 05$), utilizando el software estadístico SAS (versión 9.2; SAS Institute, Inc., 1999).

Resultados y discusión

En el análisis por qPCR, la curva estándar mostró una R² de 0.99 y una eficiencia de 62%. La eficiencia se pudo haber visto afectada por la presencia de inhibidores en la PCR o falta de especificidad en los

primers. Como se puede observar en la Figura 1, se muestra la expresión de DCN relativa a β -actina, pero no hubo diferencia estadística por grupo racial ($p > 0.05$). Sin embargo, estas son medias globales por lo que es importante analizar la expresión por individuo como se muestra en la Tabla 1.

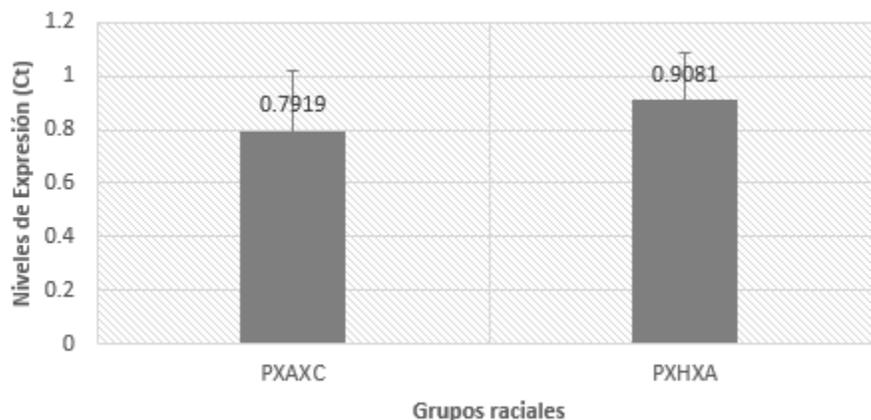


Figura 1. Medias de expresión génica de DCN relativa a β -actina, en dos grupos raciales (PxAxC y PxHxA).

En la Tabla 1 se muestran los valores de expresión génica de DCN relativa a β -actina, y se observa que en los grupos raciales existe gran variabilidad, por lo que los resultados de búsqueda de SNP podrán revelar diferencias importantes. El rango de expresión en PXAXC va de 0.473028823 a 1.021012126 Ct; mientras que en PXHXA de 0.712025098 a 1.049716684 Ct.

Tabla 1.

Expresión génica de DCN relativa a β -actina en distintas muestras.

Muestra	Grupo racial	Expresión de DCN (Método $2^{-\Delta Ct}$)
18B	PXAXC	0.473028823
9B		0.820741609
15B		0.852634892
4B		1.021012126
8B	PXHXA	0.712025098
7B		0.962594443
16B		1.049716684

De acuerdo con la Figura 2, hay una diferencia de 0.8 kg/fuerza entre grupos raciales, siendo PxAxC el que posee mayor terneza (2.1 kg/f), y PxHxA con menor terneza (2.9 kg/f). Se puede observar una tendencia que en el grupo racial que presentó más niveles de DCN, también tuvo mayor dureza.

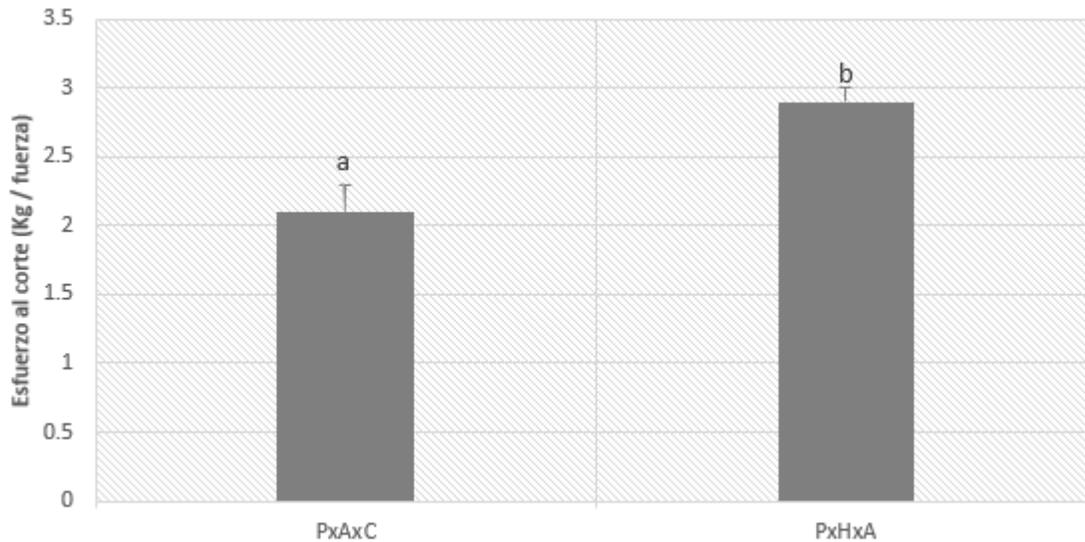


Figura 2. Esfuerzo al corte de muestras de carne de ambos grupos raciales. Las literales a y b indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0.05$).

La expresión de DCN varía debido a muchos factores, según Dubost, Micol, Lethias, y Listrat (2015) su expresión es músculo dependiente ya que encontró que la proporción de DCN con respecto al colágeno era mayor en Bíceps femoris que en Longissimus thoracis. También menciona que es mayor en la zona del Endomisio que en Perimio ($r=0.57$ y 0.52 , respectivamente). Nishimura et al. (2015) menciona que el nivel de DCN es más bajo en el músculo Semitendinoso que en el Longissimus. En nuestra investigación se analizó un solo músculo, pero en dos grupos raciales. En el presente estudio, los valores de esfuerzo al corte fueron de 2.1 kg/f en PxAxC y 2.9 kg/f en PxHxA por lo que, en el grupo racial con componente Criollo hubo una mayor terniza. Ambos grupos raciales presentan carnes muy suaves, ya que de acuerdo con Molano (2016), la terniza aceptable es aquella $< 3.2 \text{ kg/f}$. La diferencia entre grupos raciales concuerda con la revisión de Anderson, Estell, Gonzalez, Cibils y Torrell (2015), donde mencionan que, en un estudio realizado en Argentina, se examinó carne de bovinos Criollos de Argentina (*Bos taurus*) y mestizos (incluían Hereford) criados en pastizales semiáridos, muy similares a los de esta investigación y concluyeron que la carne criolla era más tierna que la de mestizos. Dentro de una misma raza, la genética controla cerca del 30% de la variación de la terniza y el 70% es explicado por el medio ambiente. El porcentaje de la raza *Bos indicus* incrementa significativamente la dureza de la carne (Anderson et al., 2017). En nuestra investigación, la diferencia de terniza observada no se debe a la presencia de *B. indicus*, ya que entre ambos grupos raciales la única diferencia es $\frac{1}{4}$ y se trata de las razas Hereford y Criollo para cada grupo (no hay alguno donde predomine la raza *Bos indicus*). Además, podemos notar que en ese estudio los esfuerzos al corte fueron más altos que los obtenidos en nuestra investigación.

Desdémona (2017) menciona que si el ganado *Bos indicus* se incluye más del 37.5% en los cruzamientos, podría haber mayor dureza de la carne. En el caso de las muestras del estudio, la raza Piedmontese de origen *Bos indicus*, está en un 50% en ambos grupos raciales y presentan una terniza aceptable, por lo que es posible que existan variantes genéticas en genes involucrados con la terniza en estos ani-

males. Desdémona (2017) reporta valores de esfuerzo al corte en promedio de 7.4 kg/f en el músculo Longissimus de animales Hereford, y 4.15 kg/f en músculos de filetes obtenidos del lomo, indicando valores muy superiores de los obtenidos aquí.

Los niveles de expresión de DCN de ambos grupos raciales son relativos, no podemos asegurar si la expresión de DCN afectó la terneza, a pesar de que PxAxC tuvo un esfuerzo al corte de 2.1 kg/f y una media de expresión de 0.7919, mientras que PxHxA un esfuerzo de corte de 2.9 kg/f y una media de expresión de 0.9081 kg/f. Para ello se deberá contar con un tamaño de muestra más grande. Sin embargo, es importante buscar posibles SNP en DCN que puedan relacionarse con la función de la proteína e incluso medir la interacción con otros genes candidatos como la calpaína proteasa y su inhibidor endógeno calpastatina; proteínas que se han caracterizado como principales factores en la terneza de la carne. En este sentido, Desgarenes et al. (2017) describe dos SNP responsables de variación del gen de μ -calpaína. El tener conocimiento sobre estos SNP, podrían sugerir la presencia de SNP en el gen de la DCN y una asociación con la terneza. Otra posible interacción de la DCN que se debería estudiar es con el colágeno, ya que la terneza de la carne depende, entre otros factores, de la cantidad de tejido conectivo que se encuentra presente en el músculo, siendo la concentración de colágeno una de las causas que incrementa la dureza de la carne (Gómez, 2016). Por otro lado, el tipo y la cantidad de PG son importantes para determinar el nivel de susceptibilidad del colágeno a la digestión enzimática; y la solubilidad del colágeno aumenta debido a la acción combinada de colagenasa con β -glucuronidasa o hialuronidasa, respectivamente. Debido a esto, puede existir la posibilidad de que las glucosidasas lisosómicas espongan las fibrillas de colágeno de los PG circundantes y faciliten su degradación por la colagenasa, lo que resulta en la desintegración del IMCT durante el envejecimiento postmortem de la carne (Nishimura et al., 2015). Por lo tanto, la cantidad de DCN puede ser mayor en el músculo in vivo que en la muestra de carne, ya que in vivo no estaría sufriendo la digestión enzimática. Esto da pauta a realizar la medición de la expresión de DCN tanto en el músculo in vivo, como en músculo ya transformado en carne. Como se mencionó anteriormente, existen estudios como evidencia de que la expresión del RNAm de DCN en el músculo Semitendinoso fue mayor que en Psoas mayor, a la vez que presentó mayor dureza, lo que permite sugerir que DCN juega un papel importante en los entrecruzamientos del colágeno (Pinilla, 2014). Por otro lado, en esta investigación se amplificó la secuencia codificante del gen de la DCN en animales de ambos grupos raciales y quedaron listas para su posterior secuenciación y búsqueda de SNP. La presencia de SNP en el gen DCN pueden asociarse a la función a nivel muscular, ya que de acuerdo con Nishimura (2015), la DCN contribuye en la formación y estabilización de las fibras de colágeno en el perimio que soportan fibras musculares ensambladas en la miogénesis; por lo que investigaciones adicionales de estructura y función de DCN son esenciales y significativas.

Conclusiones

Ambos grupos raciales presentaron valores muy similares en cuanto a la expresión relativa de DCN. Sin embargo, la terneza de la carne fue diferente, ya que los demás factores ambientales fueron iguales. Se sugiere, que la diferencia en terneza se puede deber a posibles SNP en DCN u otros genes, que puedan estar afectando la función de las proteínas.

Referencias

- Anderson, D.M., Estell, R.E., Gonzalez, A.L., Cibils, A.F. y Torell, L.A. (2015). Criollo cattle: Heritage Genetics for Arid Landscapes. *Pastizales*, 37 (2), 62-67.
- Desdémona, E. (2017). Mejora de la ternura de la carne. *Revista veterinaria*, 52 (5), 90-100.
- Desgarenes, C.M., Del Moral, S., Meza, V.M., Peña, J.M., Zárate, J.P. y Abad, J. (2017). Estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas de los genes CAPN1 Y CAST asociados a la calidad de la carne en bovinos de la Cuenca del Papaloapan. *Nova Scientia*, 9 (19), 211-228.
- Dubost, A., Micol, D., Lethias, C., y Listrat, A. (2015). New insight of some extracellular matrix molecules in beef muscles. Relationships with sensory qualities. *Animal*, 10 (5), 821-828.
- Gómez, J.A. (2016). Medición de ternura de carne vacuna usando espectroscopia dieléctrica. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología, Argentina.
- Molano, J.E. (2016). Identificación de polimorfismos de nucleótido simple en los genes de calpaína y calpastatina en ovinos criollos colombianos. Tesis de grado, Universidad de Cundinamarca Facultad de Ciencias Agropecuarias, Colombia.
- Nishimura, T. (2015). Role of extracellular matrix in development of skeletal muscle and postmortem aging of meat. *Meat Science*, 109, 48-55.
- Pinilla, Y.S. (2014). Efecto de SNPs de genes candidatos asociados a textura de la carne en bovinos *Bos indicus* y sus cruces. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de Colombia Facultad de Veterinaria y Zootecnia, Colombia.

Área Temática:
Biotecnología

Capítulo VI.

Evaluación en la producción de polisacáridos por arqueas halófilas

Evaluation of polysaccharides production by halophilic archaea

Alejandra Aragón Leóna¹,

Lorena Moreno Vileta²,

Marisela González Ávila³,

Rosa María Camacho Ruíz^{1}.*

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco A.C., Unidades:

¹Biología Industrial, ²Biología Alimentaria y ³Biología Médica y Farmacéutica

*Autor de correspondencia: * rcamacho@ciatej.mx.*

Resumen

Las arqueas halófilas son microorganismos extremófilos que necesitan altas concentraciones de cloruro de sodio para sobrevivir, se ha demostrado que tienen un alto potencial en aplicaciones biotecnológicas dentro de los cuales están los polisacáridos así como los biosurfactantes y bioemulsificantes, que presentan la cualidad de ser activos y estables a altas concentraciones de sal. Se evaluaron 11 cepas de 5 géneros distintos de arqueas pertenecientes a Haloarcula, Halorubrum, Halolamina, Natronococcus y Halobacterium suplementando el medio basal con sacarosa como fuente de carbono para la producción de polisacáridos. Se determinó que 7 arqueas halófilas pertenecientes a los géneros Haloarcula, Halolamina, Halorubrum, Natronococcus y Halobacterium probablemente son productoras de polisacáridos ya que cuando fueron cultivados en medios suplementados con sacarosa las colonias presentaron morfologías típicas de microorganismos productores de polisacáridos como son mucosidad, halos brillantes alrededor de la colonia y eran convexas.

Abstract

Halophilic archaea are extremophilic microorganisms that require high concentration of sodium chloride to survive, they offer potential applications in fields of biotechnology including polysaccharides, biosurfactants and bioemulsifiers, those molecules present properties like being active and stable at high salt concentrations. We evaluate eleven strains of halophilic archaea isolated from saline ecosystems: Haloarcula, Halorubrum, Halolamina, Natronococcus and Halobacterium as polysaccharides producers. A culture media supplemented with sucrose as carbon source was used for screening to produce polysaccharides. We determined seven halophilic archaea belonging to the genera Haloarcula,

Halolamina, Halorubrum, Natronococcus and Halobacterium are probably polysaccharide producers because when were cultivated in media supplemented with sucrose, the colonies exhibiting typical morphologies of polysaccharide producing microorganism such as mucoid, bright halo around the colony and they were convex.

PALABRAS CLAVE: Arqueas, halófilas, polisacáridos.

Introducción

Las arqueas son parte de uno de los tres dominios de la vida, en conjunto con los grupos eucariota y bacteria, dentro del dominio Archaea hay cinco filos que son Euryarchaeota, Crenarchaeota, Thaumarchaeota, Korarchaeota y Nanoarchaeota (Madigan, Martinko, Sender, Buckley & Stahl, 2015). Generalmente estos microorganismos son extremófilos, es decir, viven en condiciones elevadas de temperaturas, pH y concentraciones de sal denominados halófilos, estos son clasificados de acuerdo con la concentración de cloruro de sodio que necesitan para crecer de manera óptima como bajo 0.2-0.85 M (1-5%); moderado a 0.85-3.5 M (5-20%) y extremo 3.4-5.1 M (20-30%). Los requerimientos de iones de sodio dependen de la temperatura, pH y medio de crecimiento (Amoozegar, Safarpour, Noghabi, Bakhtiary & Ventosa, 2019).

Las arqueas halófilas se caracterizan por vivir en ecosistemas hipersalinos distribuidos en diferentes áreas de la tierra como lagos salados, marismas y suelos salinos. La salina de Santa Bárbara, Sonora, en México de donde se aislaron cepas pertenecientes a los géneros Haloarcula, Halorubrum y Halolamina es un área productora de sal en una zona no protegida y es clasificada como un humedal salado que tiene una biodiversidad de especies halófilas, incluyendo bacterias y arqueas (Vázquez et al., 2021); el Salar de Uyuni ubicado en Bolivia donde se aislaron Halobacterium salinarum y Halorubrum tebenquinchense también es un ecosistema heterogéneo en donde están presentes bacterias y arqueas halófilas y halotolerantes, es decir, microorganismos capaces de crecer en ausencia o presencia de sal (Delgado et al., 2019). Finalmente Natronococcus fue aislado de las aguas de Golea Sebkh, localizado en el Sahara de Argelia que contiene concentraciones salinas de hasta 300 g/L (Bhatnagar, 2005).

Los microorganismos halófilos juegan un papel importante dentro de la industria ya que producen pigmentos rojizos que son carotenoides de 50 átomos de carbono empleados como colorante, aditivo alimenticio, antioxidante, antitumoral y agente preventivo para evitar enfermedades al corazón (Naziri, 2014); proteínas retinianas, enzimas hidrolíticas, biofertilizantes y polisacáridos, los cuales son polímeros de carbohidratos de alto peso molecular, generados como mecanismo de resistencia al estrés biótico y señalización, permitiendo la protección de la integridad de la membrana celular (Corral, Amoozegar & Ventosa, 2019).

Los polisacáridos sintetizados por las arqueas halófilas, pueden tener una amplia variedad estructural incluyendo los polisacáridos intra y extracelulares denominados exopolisacáridos, que están compuestos por azúcares y son secretados al medio ambiente circundante por los microorganismos.

Los principales azúcares presentes en los polisacáridos de arqueas son la manosa, glucosa, galactosa y ramnosa. Se ha reportado que Haloferax produce un polímero conformado por β -D-Glucosa(1,6)- α -D-manosa-(1,4)- β -D-Glucosa, con unidades acetiladas y sulfatadas; por otro lado, el género de Haloarcula presenta polímeros formados por manosa, galactosa y glucosa (Nicolaiou, Kamburova & Toksoy, 2009).

Según los reportes de Demirici, Hasköylü, Eroğlu, Hemberger & Toksoy en 2020, los polisacáridos de tipo levano producidos por la bacteria halófila *Halomonas*, han sido empleados para la elaboración de hidrogeles con la finalidad de tener una liberación controlada de anfotericina B para el tratamiento antimicótico local dérmico de *Candidias*, además de encontrar que el valor de hinchamiento más alto en el hidrogel se logró con condiciones de pH básico, el cual ha sido el más alto reportado para los hidrogeles basados en levanos.

En estudios previos han mostrado que los polisacáridos producidos poseen propiedades tecno-funcionales como gelificantes, estabilizantes y emulsionantes; presentando beneficios a la salud como antimicrobianos y antioxidantes para su uso dentro de la industria alimentaria; a nivel ambiental pueden ser empleados para inmovilizar metales pesados como plomo y cobre (López et al., 2020).

El objetivo de este trabajo fue identificar las posibles arqueas halófilas productoras de polisacáridos de acuerdo con la morfología que presentan en un cultivo sólido suplementado con sacarosa.

Materiales y métodos

Microorganismos y condiciones de cultivo

Se analizaron 11 arqueas halófilas; 8 fueron aisladas de la Salina de Santa Bárbara, Sonora, pertenecientes a los géneros *Haloarcula*, *Halorubrum* y *Halolamina*; *Natronococcus* de las aguas de Golea Sebkha, localizado en el Sahara de Argelia; *Halobacterium salinarum* y *Halorubrum tebenquinchense* del Salar de Uyuni en Bolivia.

Las cepas se reactivaron y cultivaron en el medio ATCC2185 que se esterilizó con la concentración final de (g/L): NaCl, 233.6; MgSO₄·7H₂O, 20; citrato de sodio, 3; KCl, 2; extracto de levadura, 3; tripton, 5; y 0.1 mL/L de la solución de elemento traza (en g/L; ZnSO₄·7H₂O, 6.6; MgSO₄·7H₂O, 1.7; Fe(NH₄)(SO₄)₂·6H₂O, 3.9; CuSO₄·5H₂O, 0.7). Se ajustó el pH a 8 antes de esterilización (121°C, 15 minutos). Todas las cepas fueron reactivadas en medio líquido, incubadas a 250 RPM y 40°C, durante siete días.

Búsqueda de cepas productoras de polisacáridos en medio sólido

Se suplementó el medio ATCC2185 con 10 g/L de agar y 50 g/L de sacarosa, de una solución de sacarosa concentrada (600 g/L) previamente esterilizada para evitar las reacciones de Maillard. Se tomó una asada de cultivo fresco y se estrió en platos de agar para observar su morfología en estereoscopio; se consideraron como colonias productoras de polisacáridos aquellas que exhibían morfologías mucoides, convexas y brillantes (Kirtel, Versluys, Van den Ende & Toksoy, 2018).

Para realizar la evaluación de lo mucoide en la cepa con un asa estéril se tomó una colonia para identificar su textura; las colonias convexas presentaban una elevación curva en la morfología de la colonia y lo brillante era por un halo transparente que se formaba alrededor de la colonia.

Resultados y discusión

Todas las arqueas halófilas crecieron en el medio suplementado con sacarosa, 7 cepas fueron seleccionadas pertenecientes al género *Haloarcula*, *Halolamina*, *Halorubrum*, *Natronococcus* y *Halobacterium* (Tabla 1) como posibles productoras de polisacáridos de acuerdo con los criterios expuesto por Kirtel et al., 2018.

Nicolaous, Kamburova & Toksoy, 2009 han reportado que los géneros de arqueas halófilas que pueden excretar polisacáridos son Haloferax, Haloarcula, Halococcus, Natronococcus y Halobacterium, algunos coinciden con los elegidos por la morfología que presentaban.

Tabla 1.

Criterios de selección preliminar para identificar posibles cepas productoras de polisacáridos.

Cepa	Género	Procedencia	Mucosidad	Brillante	Convexa
1	<i>Haloarcula</i>	Salina de Santa Bárbara, Sonora	□ □ □	□ □	□
2	<i>Halorubrum</i>	Salina de Santa Bárbara, Sonora	□	□	□
3	<i>Halolamina</i>	Salina de Santa Bárbara, Sonora	□ □	□ □	□
4	<i>Halorubrum</i>	Salina de Santa Bárbara, Sonora	□ □	□ □	□
5	<i>Halorubrum</i>	Salina de Santa Bárbara, Sonora	□	□	□
6	<i>Halorubrum</i>	Salina de Santa Bárbara, Sonora	□	□	□
7	<i>Halorubrum</i>	Salina de Santa Bárbara, Sonora	□	□	□
8	<i>Halorubrum</i>	Salina de Santa Bárbara, Sonora	□	□ □	□
9	<i>Natronococcus</i>	Lago Salado Golea Sebkh, Argelia	□	□ □	□
10	<i>Halobacterium salinarum</i>	Salar de Uyuni, Bolivia	□	□ □	□
11	<i>Halorubrum tebenquinchense</i>	Salar de Uyuni, Bolivia	□	□ □	□

Cepas seleccionadas.

Mucosidad: □ Nivel baja de mucosidad; □ □ Nivel medio de mucosidad; □ □ □ Nivel alto de mucosidad.

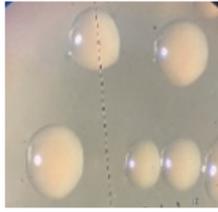
Brillante: □ Halo pequeño formado; □ □ Halo prominente formado.

Convexa: □ Sí es convexa; □ Presenta otra morfología.

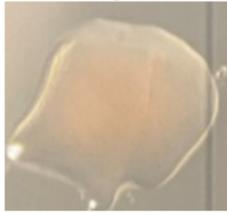
Se tomó en cuenta principalmente la formación de un halo brillante alrededor de las colonias de color transparente debido a que probablemente sea la acumulación de polisacárido como lo menciona López et al., 2020 (Figura 1); estos autores reportaron que la arquea halófila *Haloferax mucosum* produjo un exopolisacárido de 152 kDa, con actividades emulsionantes en rangos amplios de temperatura, pH y concentraciones de cloruro de sodio.

Según reportes por Kirtel, Versluys, Van den Ende & Toksoy en 2018, arqueas pertenecientes a la clase de halófilas del género *Halomicrobium*, *Haloferax* y *Natronococcus* son capaces de producir levanos o inulinas con diferentes grados de ramificación (10-16%), estos polisacáridos se obtuvieron al suministrar 50 g/L de sacarosa en el medio basal, por lo que el halo presente alrededor de *Natronococcus* pudiera ser el polisacárido envolviendo a las células.

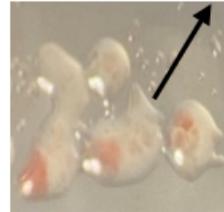
Salina de Santa Bárbara, Sonora



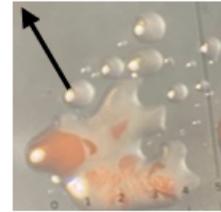
Ceba 1
Haloarcula



Ceba 3
Halolamina

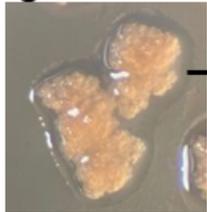


Ceba 4
Halorubrum



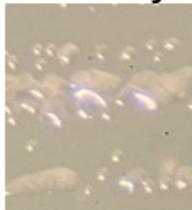
Ceba 8
Halorubrum

Lago Salado Golea Sebkh, Argelia

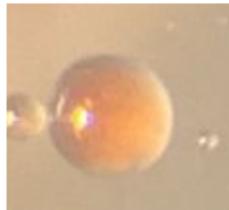


Ceba 9
Natronococcus

Salar de Uyuni, Bolivia



Ceba 10
Halobacterium



Ceba 11
Halorubrum

Figura 1. Cepas seleccionadas como posibles productoras de polisacáridos por halo transparente formado alrededor de las colonias.

Conclusiones

Arqueas halófilas pertenecientes a los géneros Haloarcula, Halolamina, Halorubrum, Natronococcus y Halobacterium probablemente son productoras de polisacáridos ya que presentaron mucosidad, halos brillantes alrededor de la colonia y con morfología convexa.

Agradecimientos

Agradecimiento especial al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco por el financiamiento del proyecto, al área de Biotechnología Industrial por permitir el uso de sus instalaciones y a la beca otorgada por El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para llevar a cabo la maestría en innovación biotechnológica.

Referencias

- Amoozegar, M. A., Safarpour, A., Noghabi, K. A., Bakhtiary, T., & Ventosa, A. (2019). Halophiles and Their Vast Potential in Biofuel Production. *Frontiers in microbiology*, 10.
- Bhatnagar, T., Boutaiba, S., Hacene, H., Cayol, J.L., Fardeau, M.L., Ollivier, B., & Baratti, J. C. (2005). Lipolytic activity from Halobacteria: Screening and hydrolase production. *FEMS Microbiology Letters*, 248(2), 133–140. doi:10.1016/j.femsle.2005.05.044
- Corral, P., Amoozegar, M. A. & Ventosa, A. (2019). Halophiles and Their Biomolecules: Recent Advances and Future Applications in Biomedicine. *Marine drugs*, 33. <https://doi.org/10.3390/md18010033>
- Delgado, M., Flores, A. C., Kirchmayr, M., Rodríguez, J., Mateos, J. C., Aguilar, C. N. & Camacho, R. M. (2019). Bioprospection of proteases from *Halobacillus andaensis* for bioactive peptide production from fish muscle protein. *Electronic Journal of Biotechnology*. doi:10.1016/j.ejbt.2019.03.001
- Demirci, T., Hasköylü, M.E., Eroğlu M.S., Hemberger, J. & Toksoy, E. (2020). Levan-based hydrogels for controlled release of Amphotericin B for dermal local antifungal therapy of Candidiasis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 145, 105255. doi: 10.1016/j.ejps.2020.105255
- Kırtel, O., Versluys, M., Van den Ende, W., & Toksoy Öner, E. (2018). Fructans of the saline world. *Biotechnology Advances*, 1524–1539
- López, M. A., Rodríguez, A. I., Camacho, R. M., Córdova, J., López, M., Chavarría, N. & González, Y. (2020). Physicochemical characterization and emulsifying properties of a novel exopolysaccharide produced by haloarchaeon *Haloferax mucosum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 142, 152-162.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S. & Stahl, D. A. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos*. Madrid, España: PEARSON.
- Naziri, D. H. (2014). Analysis of Carotenoid Production by *Halorubrum* sp. TBZ126; an Extremely Halophilic Archeon from Urmia Lake. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2014, 61-67.
- Nicolaous, B., Kamburova, M. & Toksoy, E. (2009). Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. *Environmental technology*, 31, (10), 1142-1158.
- Vázquez, A. S., Barbachano, A., Arellano, M., Kirchmayr, M. R., Finore, I., Poli, A., Nicolaus, B., De la Torre, S. & Camacho, R. M. (2021). Effect of Carbon Sources in Carotenoid Production from *Haloarcula* sp. M1, *Halolamina* sp. M3 and *Halorubrum* sp. M5, Halophilic Archaea Isolated from Sonora Saltern, Mexico. *Microorganisms*, 9(5), 1096. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051096>.

Capítulo VII.

Desinfección de folíolos de pecanero adulto, durante la temporada, para su cultivo in vitro

Disinfection of adult pecan leaflets, throughout the season, for in vitro cultivation

*Valeria Gándara Ledezma**,

Lorena Tineo García,

Marco Antonio Gutiérrez Coronado

Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora

**Autor de correspondencia: vale.gandara.ledezma@gmail.com*

Resumen

El nogal pecanero (*Carya illinoensis*) es una especie vegetal de interés agronómico, que se caracteriza por su longevidad y hojas caducas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la oxidación en folíolos de pecanero adulto, desinfectados y cultivados in vitro, recolectados en distintos meses de la temporada, para el establecimiento de una fecha óptima de muestreo. El procedimiento de recolección de folíolos de nogal pecanero adulto fue replicado 16 veces, en el periodo abril-agosto de 2021. Con cada réplica de muestreo, se realizó un determinado número de desinfecciones. Al final de cada desinfección se evaluó la oxidación del tejido, y los folíolos saludables fueron cultivados in vitro, e incubados por 50 días. Se comprobó que es más adecuado recolectar folíolos de pecanero adulto en abril, ya que fue el mes en el que se presentó un grado de oxidación significativamente inferior.

Abstract

Pecan trees (*Carya illinoensis*) are a plant species of agronomic interest, characterized by its longevity and deciduous leaves. The objective of this study was to evaluate the oxidation in adult pecan leaflets, disinfected and in vitro cultivated, collected in different months of the season, for the establishment of an optimal collection date. The procedure for collecting adult pecan leaflets was replicated 16 times, between April and August 2021. With each replication of collection, a certain number of disinfections were carried out. At the end of each disinfection, the oxidation of the tissue was qualitatively evaluated, and the healthy leaflets were cultured in vitro, and incubated for 50 days. It was found that it is more appropriate to collect adult pecan leaflets in April, since it was the month in which a significantly lower degree of oxidation occurred.

PALABRAS CLAVE: *Carya illinoensis*, carbendazim, lluvia, oxidación, contaminación

Introducción

El tipo y cantidad de microorganismos presentes en un tejido depende de la especie vegetal, el hábitat en el que creció el individuo, la temporada en la que la muestra de tejido es recolectada, así como la edad, salud y vigor de la planta (Bunn y Tan, 2002).

Entre más joven es el tejido vegetal, menor será la incidencia de contaminación microbiana superficial y endógena (Bunn y Tan, 2002). Esto se debe a que las infecciones microbianas se acumulan en la planta; por ejemplo, la colonización fúngica es superior en hojas de mayor edad (Saikkonen, 2007). Schan et al. (2018) comprobaron que, en el caso del abeto de noruega (*Picea abies*), los árboles mayores tienen una población de hongos más diversa que los árboles jóvenes, considerando árboles de 70 y 10 años de edad, respectivamente. De igual modo, se ha comprobado que el follaje joven generalmente tiene una colonización fúngica menos pronunciada que el follaje maduro (Stone et al., 2004).

Reconocer que la edad de la planta e incluso la edad específica del tejido que será usado como fuente de explantes, influye en la cantidad y diversidad de microorganismos presentes, adquiere relevancia cuando tenemos interés por cultivar tejido de árbol *in vitro*, pues los árboles son especies particularmente longevas (Issartel y Coiffard, 2011).

El nogal pecanero (*Carya illinoensis*) no es la excepción en lo que respecta a la longevidad de los árboles. Esta leñosa puede llegar a vivir por cientos de años (Joyce et al., 2006). De acuerdo con el análisis de anillos anuales, es común que los nogales pecaneros alcancen los 100 años de edad, y se estima que la longevidad máxima de esta especie es de 300 años. Incluso se ha reportado la existencia de un nogal pecanero de 400 años de edad, establecido en Jiménez, México (Chung et al., 1995).

Además de la edad del tejido, se debe considerar el impacto que tiene la fecha de su recolección sobre el éxito del cultivo *in vitro*. Si se contempla el explante de foliolo como material para el cultivo *in vitro* de nogal pecanero, se deben tener en cuenta dos limitantes: en primer lugar, *C. illinoensis* es un árbol caducifolio (Joyce et al., 2006), por lo tanto, no es posible disponer de hojas en todo momento del año. En el Valle del Yaqui, por ejemplo, el nogal pecanero empieza a producir su follaje a mediados de marzo, y lo pierde en diciembre-enero. En segundo lugar, las condiciones ambientales cambian cada mes, y modifican el desempeño de los explantes.

La elevada incidencia de luz, las bajas temperaturas, las infecciones por microorganismos patógenos, y las deficiencias nutrimentales, son fuentes ambientales de estrés que pueden inducir la síntesis de compuestos fenólicos y la producción de especies oxidativas, como los radicales libres, en los tejidos de las plantas (Grace y Logan, 2000). Como consecuencia de la exposición a estos factores ambientales, se puede presentar oscurecimiento en los tejidos vegetales, el cual generalmente se debe a la oxidación de compuestos fenólicos, por acción de la enzima polifenoloxidasas (Babaei et al., 2013).

En un estudio realizado con tejido de pera silvestre (*Pyrus pyrifolia*), se observó que el establecimiento aséptico de yemas era significativamente superior en yemas recolectadas en primavera y en invierno, que en yemas recolectadas en temporada de lluvias. Además, los antioxidantes utilizados para mitigar el oscurecimiento enzimático del tejido de pera silvestre, perdieron efectividad en muestras recolectadas en verano, la temporada de lluvias y otoño, en comparación con las muestras recolectadas en primavera e invierno. Esto puede deberse a que las yemas concentran una mayor cantidad de compuestos fenólicos en las fechas en que se presenta la mayor incidencia de oxidación (Thakur y Kanwar, 2008). De hecho, uno de los mayores problemas que enfrenta la micropropagación es la contaminación fún-

gica en yemas. Se ha observado que, en el cultivo in vitro de yemas de falsa pimienta negra (*Embelia ribes*) de la India, la mayor incidencia de contaminación se presenta en el periodo comprendido entre junio y octubre, el cual se caracteriza por humedad elevada, bajas temperaturas y lluvias recurrentes (Dhavalá y Rathore, 2010).

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue evaluar el oscurecimiento oxidativo y contaminación microbiana, en foliolos de nogal pecanero adulto, sometidos a desinfección y cultivo in vitro, recolectados en distintos meses de la temporada, para el establecimiento de una fecha óptima de muestreo.

Materiales y métodos

Material biológico.

Se recolectaron hojas completas de árboles de nogal pecanero de 16 años de edad, del cultivar *Wichita*, provenientes de un huerto de 50 ha, ubicado en el bloque 1010 del Valle del Yaqui (Cd. Obregón, Sonora, México), con coordenadas 27°20'23.26"N y 109° 55'42.83"O. Las recolecciones se realizaron durante la mañana, entre abril y agosto de 2021. Inmediatamente después del corte de cada hoja, se aplicó solución de 25 g/L de sulfato cúprico en la zona de corte del pecíolo, y se pulverizó la superficie de la hoja con solución antioxidante de ácido ascórbico (0.125 g/L) y ácido cítrico (0.075 g/L).

Selección de foliolos. Durante la selección de los foliolos, se descartaron aquellos que presentaban lesiones causadas por la incidencia de luz solar o mordeduras de insectos, así como los foliolos contaminados por excremento de aves. Y únicamente se trabajó con foliolos apicales.

Desinfección del tejido vegetal.

Se pesaron aproximadamente 3 g de foliolos enteros, después éstos fueron desinfectados mediante inmersión consecutiva en una serie de soluciones desinfectantes y agua, en agitación constante. Se utilizaron 200 mL de cada solución mencionada. El orden de las soluciones y los tiempos de inmersión fueron los siguientes: etanol al 70% (v/v) por 2 min; solución a 1.8-2.7% de hipoclorito de sodio, adicionada con 2 gotas/L de Tween 80 por 2 min; agua destilada estéril durante 1 min, cuatro veces; solución fungicida de Carbendazim [1 g/L en las desinfecciones efectuadas del 20 de abril al 20 de mayo, y 8.8 g/L en las desinfecciones efectuadas del 26 de mayo al 20 de agosto], adicionada con 2 gotas/L de Tween 80, por 20 min; y agua destilada estéril por 1 min, cuatro veces. Al final de la desinfección, los foliolos fueron sumergidos en solución de ácido ascórbico (0.125 g/L) con ácido cítrico (0.075 g/L) durante 12 h.

Descripción del explante y medio de cultivo.

Los foliolos desinfectados fueron disectados en campana de flujo laminar. Se cortaron piezas de aproximadamente 1 cm², las cuales fueron sembradas individualmente, en medio de cultivo compuesto por 30 g/L de sacarosa, 7.5 g/L de agar bacteriológico, 1.46 g/L de sales de Murashige y Skoog con componentes orgánicos M6899 (Sigma, México), 1 ppm de ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Desarrollo del cultivo.

Los explantes cultivados fueron incubados por 50 días, a 25°C, en ausencia de luz.

Diseño experimental.

Se aplicó un diseño en bloques incompletos. Las unidades experimentales (los folíolos enteros) fueron clasificadas en dos grupos homogéneos (folíolos apicales, y el resto de los folíolos de la hoja). El único bloque sometido al tratamiento de desinfección, fue el constituido por los folíolos apicales. Las variables independientes contempladas fueron el ortet, localización del folíolo en la hoja compuesta, localización de la hoja en la corona del árbol, e integridad de la hoja. Las variables dependientes consideradas fueron el oscurecimiento enzimático en folíolos desinfectados y la contaminación microbiana en los explantes cultivados.

Resultados y discusión

El procedimiento de recolección de folíolos de nogal pecanero en huerto, fue replicado 16 veces. Y con cada réplica de muestreo, se realizó un determinado número de desinfecciones (n). Este número n fue considerado el 100% de las repeticiones del proceso de desinfección realizadas por muestreo. En la Figura 1, se muestra el porcentaje de desinfecciones que resultaron exitosas en cada muestreo, entendiendo por exitosa a toda aquella desinfección que resultó en folíolos con, al menos, 15 cm² de tejido libre de oscurecimiento oxidativo (y por ende, apto para el cultivo in vitro).

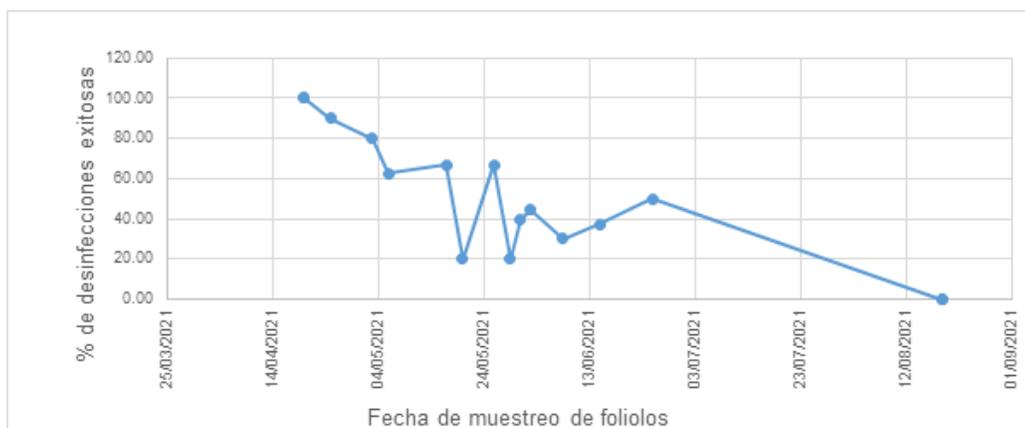


Figura 1. Réplicas exitosamente desinfectadas, según la fecha de recolección de los folíolos en campo.

Nuestros resultados concuerdan con los de Wang et al. (2020), quienes trabajaron en el cultivo in vitro de segmentos de tallo de kiwi (*Actinidia deliciosa*) y comprobaron que éstos sufrían un oscurecimiento enzimático significativamente inferior cuando eran recolectados en abril. Ellos observaron que la tasa de oxidación aumentaba gradualmente con el paso de la temporada, alcanzando su máximo nivel en septiembre.

En agosto, durante la recolección de folíolos, se observó que prevalecía un aspecto oscurecido en las hojas de los árboles de nogal pecanero. Y, a pesar de que se recolectaron únicamente hojas de apariencia saludable, los folíolos seleccionados se oxidaron por completo al terminar su proceso de desinfección.

Tabla 1.

Repeticiones del tratamiento de desinfección que presentaron un grado de oxidación mínima y que, por lo tanto, fueron aptas para el cultivo in vitro.

Fecha de muestreo	% de repeticiones de desinfección exitosas	CV
20 y 25 de abril	96.67±5.77 ^a	0.06
20, 26 y 29 de mayo	42.22±23.41 ^b	0.55
15 y 25 de junio	43.75±8.84 ^b	0.20
19 de agosto	0.00±0.00 ^b	0

Los datos son la media del porcentaje de repeticiones exitosamente sembradas. Los distintos superíndices indican diferencias significativas entre medias (ANOVA de una vía $P < 0.05$). \pm señala la desviación estándar

La Tabla 1, explica que las desinfecciones efectuadas en la segunda mitad del mes de abril, resultaron en una cantidad significativamente superior de folíolos sanos, en comparación con las desinfecciones aplicadas en la segunda mitad de los meses de mayo, junio y agosto. De manera que, en abril, hubo una menor pérdida de folíolos a causa del oscurecimiento oxidativo, previo a su cultivo in vitro.

Por otra parte, para evaluar la incidencia de contaminación, en función de la temporada de muestreo, las réplicas y repeticiones fueron redefinidas. Se consideró réplica a cada lote de 2-3 g de folíolos enteros que fueron desinfectados simultáneamente, en el mismo recipiente. Asimismo, se consideró repetición a cada uno de los 15 explantes disectados a partir de un lote de folíolos desinfectados.

No hubo una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de explantes contaminados, según el día de muestreo y desinfección. Sin embargo, en la Tabla 2, se observa que, en el mes de abril, la incidencia de contaminación microbiana fue notoriamente inferior a la observada en los siguientes meses de la temporada.

Las diferencias en la incidencia de contaminación microbiana en los meses de primavera y verano, pueden ser ocasionadas por cambios en la humedad relativa y temperatura ambiental.

Tabla 2.

Porcentaje de explantes contaminados, en réplicas del tratamiento de desinfección, después de 50 días de incubación

Fecha de siembra	% total de explantes contaminados	CV
26/04/2021	2.67±3.65	1.37
07/05/2021	9.33±10.11	1.08
18/05/2021	21.33±20.76	0.97
27/05/2021	14.66±2.98	0.20
01 y 03/06/2021	13.33±8.16	0.61
21/08/2021	30.67±21.40	0.70

Los datos son la media del porcentaje de contaminación observado en 5 réplicas del tratamiento de desinfección. \pm señala la desviación estándar de $n=15$ (15 explantes de foliolo).

La humedad atmosférica generalmente es el factor ambiental más determinante para la severidad de la contaminación fúngica en las plantas. Los hongos que son transmitidos a través del aire, infectan las plantas con mayor facilidad cuando la temperatura ambiental es de 15-40°C. Asimismo, el crecimiento de hongos se ve favorecido por la humedad elevada y temperaturas moderadas, por otra parte, la baja humedad, así como las temperaturas extremas, inhiben el crecimiento del hongo y la germinación de esporas (Talley et al., 2002).

En la presente investigación, los foliolos desinfectados en agosto, fueron los más afectados por la presencia de contaminación fúngica. Esta situación puede deberse a que agosto es el mes más cálido y húmedo del verano. Por ejemplo, en la primavera y verano de 2015, en el Valle del Yaqui, se registraron los siguientes promedios de temperatura diurna y temperatura nocturna: 29°C y 17°C en abril, 33°C y 19°C en mayo, 35°C y 27°C en junio, y 35°C y 29°C en julio y agosto. Asimismo, se reportaron los siguientes promedios de porcentaje de humedad relativa diurna y humedad relativa nocturna: 35 y 75 en abril, 20 y 57 en mayo, 35 y 62 en junio, 45 y 67 en julio, y 55 y 77 en agosto (Leyva-Corona et al., 2015).

Conclusiones

La fecha óptima de muestreo de foliolos de nogal pecanero adulto, que han de ser cultivados in vitro, son los días del mes de abril, ya que, las muestras recolectadas en este mes, pueden ser sometidas a los tratamientos de desinfección sin padecer un excesivo oscurecimiento oxidativo. Además, los muestreos en abril también resultaron en una incidencia de contaminación microbiana inferior a la encontrada en explantes provenientes de foliolos recolectados en meses posteriores. Conforme avanza la temporada, se reduce el potencial de los foliolos como fuente de explantes.

Referencias

- Babaei, N., Abdullah, N. A. P., Saleh, G., & Abdullah, T. L. (2013). Control of contamination and explant browning in *Curculigo latifolia* in vitro cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(8), 448-454.
- Bunn, E., & Tan, B. (2002). Microbial contaminants in plant tissue culture propagation. In *Microorganisms in plant conservation and biodiversity* (pp. 307-335). Springer, Dordrecht.
- Chung, C. S., Harris, M. K., & Storey, J. B. (1995). Mastig in pecan. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(3), 386-393.
- Dhaval, A., & Rathore, T. S. (2010). Micropropagation of *Embelia ribes* Burm f. through proliferation of adult plant axillary shoots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(2), 180-191.
- Grace, S. C., & Logan, B. A. (2000). Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1402), 1499-1510.
- Issartel, J., & Coiffard, C. (2011). Extreme longevity in trees: live slow, die old? *Oecologia*, 165(1), 1-5.

Área Temática: **Biotecnología**

- Joyce, K. M., Boyd, J., & Viernes, J. L. (2006). Contact dermatitis following sustained exposure to pecans (*Carya illinoensis*): a case report. *Cutis*, 77(4), 209-212.
- Leyva-Corona, J. C., Armenta-Castelo, D. I., Zamorano-Algandar, R., Thomas, M. G., Rincon, G., Medrano, J. F., Rivera-Acuña, F., Reyna-Granados, J. R. & Luna-Nevárez, P. (2015). Variables climáticas asociadas a la producción de leche en vacas Holstein criadas bajo condiciones de estrés por calor del Valle del Yaqui, México. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 11(1), 1-11.
- Saikkonen, K. (2007). Forest structure and fungal endophytes. *Fungal Biology Reviews*, 21(2-3), 67-74.
- Schön, M. E., Nieselt, K., & Garnica, S. (2018). Belowground fungal community diversity and composition associated with Norway spruce along an altitudinal gradient. *PloS one*, 13(12), e0208493.
- Stone, J. K., Polishook, J. D., & White, J. F. (2004). Endophytic fungi. *Biodiversity of Fungi*. Elsevier Academic Press, Burlington, 241-270.
- Talley, S. M., Coley, P. D., & Kursar, T. A. (2002). The effects of weather on fungal abundance and richness among 25 communities in the Intermountain West. *BMC ecology*, 2(1), 1-11.
- Thakur, A., & Kanwar, J. S. (2008). Micropropagation of 'Wild Pear' *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai. I. Explant Establishment and Shoot Multiplication. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 36(1), 103-108.
- Wang, R., Song, Q., Kongd, L., & Zhang, Y. (2020). Browning Treatment in Tissue Culture of 'Miliang 1' Delicious Kiwifruit. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 740, No. 1, p. 012194). IOP Publishing.

Capítulo VIII.

Identificación de *Salmonella* spp. por PCR en biosólidos de una planta tratadora de agua residuales

Molecular identification of *Salmonella* spp. in biosolids from a wastewater treatment plant

*Andrés Francisco Chávez Almanza**,

Elia Yeniva García Castro,

Ernesto Uriel Cantú Soto,

Abel Alberto Verdugo Fuentes

Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora

**Autor de correspondencia: mandres.chavez@itson.edu.mx*

Resumen

Las aguas residuales (AR) poseen contaminantes provenientes de diversas fuentes de origen. Durante el proceso de tratamiento de AR se generan biosólidos con elevados niveles de contaminantes, entre los que se encuentran patógenos como la bacteria *Salmonella* spp. Con la finalidad que los biosólidos sean reutilizados en diferentes actividades sin riesgo para la población, se planteó como objetivo la identificación de *Salmonella* spp mediante técnicas de cuantificación tradicionales y moleculares. Se estandarizó una técnica de extracción de ADN de *Salmonella* spp. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas del ADN total, para evaluar la sensibilidad de la técnica de PCR. Se analizaron dos muestras de biosólidos basados en la NOM-004-SEMARNAT-2002 (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), 2002). Se establecieron las condiciones para la extracción de ADN y la sensibilidad de la técnica de PCR, las cuales permitieron la detección de *Salmonella* spp. de forma más eficiente.

Abstract

Wastewater (WW) contains contaminants from various origins. During the WW treatment process, biosolids are generated with high levels of contaminants, including pathogens such as the bacteria *Salmonella* spp. To reuse biosolids in different activities without risk to the population, the objective was to identify *Salmonella* spp. through traditional and molecular quantification techniques. A DNA extraction technique for *Salmonella* spp. was standardized. Subsequently, serial dilutions of total DNA were performed to evaluate the sensitivity using the PCR technique. Two biosolids samples were analyzed based on NOM-004-SEMARNAT-2002 (SEMARNAT, 2002). The conditions for DNA extraction and the sensitivity of the PCR technique were established, which allowed the detection of *Salmonella* spp. in a more efficient way.

PALABRAS CLAVE: Biosólidos, Salmonella spp, PTAR, PCR

Introducción

En el mundo y en México, la crisis de agua va en aumento debido a diversos factores, entre los cuales destaca el incremento y concentración de la población, así como al uso desmedido del agua en plantas industriales (Duran-Juárez, & Torres-Rodríguez, 2006). Esto ha propiciado la edificación de plantas tratadoras de aguas residuales que dan tratamiento a las aguas negras de forma que sea aceptable para su utilización en las áreas de la agricultura, riego de parques y recarga de los mantos acuíferos (Rojas-Remis, & Mendoza-Espinosa, 2012).

En el año 2011 se produjeron alrededor de 6.7 millones de m³ de aguas residuales, desencadenando una producción de 640,000 t de lodos residuales en el 2011 y con estimaciones 880,000 t para el año 2031 (Rojas-Remis, & Mendoza-Espinosa, 2012). En los lodos residuales se pueden encontrar diversos microorganismos patógenos, como es el caso de la Salmonella spp., un bacilo Gram negativo perteneciente al grupo de la familia Enterobacter. Pueden provocar salmonelosis, por medio de S. typhi enterica serovar y por S. paratyphi. La cual es una infección severa que es capaz de generar complicaciones como: calambres abdominales, fiebre, vómito, diarrea y malestar estomacal, incluso en algunos casos la muerte (Qu et al., 2012). Por lo antes mencionado el objetivo general de esta investigación fue el Identificar la presencia de Salmonella spp, en muestras de biosólidos mediante técnicas de cuantificación tradicionales y moleculares para comprobar si cumple con las especificaciones de la NOM-004-SE-MARNAT-2002 (SEMARNAT, 2002).

Materiales y métodos

Obtención de la muestra

Se empleó una cepa de Salmonella spp. previamente identificada y conservada en caldo tripticasa de soya con glicerol al 15% a -70° C. La cepa criopreservada se sembró en una caja Petri con agar tripticasa de soya (ATS) por el método de estrías por agotamiento, incubándose a 36 °C por 24 h.

Extracción de ADN

Se analizaron tres métodos para encontrar el más eficiente. El primer método empleado fue con columnas Qiagen (DNAesy Blood & Tissue Handbook), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El segundo método fue el de extracción por hervido, descrito en el Manual de Análisis Bacteriológico (BAM, por sus siglas en inglés) (Feng, et al., 2020). El tercer método de extracción se realizó con el Protocolo de extracción de ADN por separación de fases (Raeder y Broda, 1985), con la siguiente modificación, se tomó 1 mL de caldo tripticasa de soya con cultivo bacteriano de 24 h de incubación, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min., hasta formar una pastilla, se retiró el sobrenadante y se continuó con lo descrito en protocolo.

Cuantificación del ADN

Las extracciones de ADN se cuantificaron en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (ThermoFisher, Inc., Wilmington DE, EE.UU.), utilizando 1µL de muestra. Se evaluaron las relaciones de pureza 260/280 y 260/230, para considerar una muestra de ADN pura.

Integridad de ADN. Se realizó mediante un gel de agarosa al 1%. Tomándose 1 µL de Buffer 6X y 5 µL de muestra de ADN. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1Kb, las condiciones del equipo

de electroforesis fueron 90 V por 50 minutos, posteriormente se visualizó en MiniBis Pro (DNR Bio Imaging System, Neve Yamin, Israel).

Sensibilidad de la PCR

Se tomó el ADN extraído del proceso más eficaz, para determinar el número de copias que se tenía, usando una calculadora científica del programa “Sciecie Primer” (<https://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>), se realizaron diluciones seriadas para disminuir el número de copias y determinar por medio de PCR la cantidad mínima necesaria para que el termociclador las amplifique, esto se realizó por triplicado para tener una validez estadística.

Especificidad de los oligonucleótidos

Se realizaron corridas de PCR a temperaturas de alineamiento de 53, 54, 55, 56, 57 y 58 °C, esto con el fin de visualizar una mejor banda en el gel de agarosa de la electroforesis, a la par se corrió un control negativo para corroborar su integridad. Se utilizaron los oligonucleótidos con las cepas *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, para determinar la especificidad con *Salmonella* spp.

Condiciones para PCR

Se utilizó una mezcla con volumen final de reacción de 12.5 µL compuesto por agua ultra pura, 3 µM de MgCl₂, 1 µM de buffer 10X (-MgCl₂), 0.2 µM de dNTP's, 0.2 µM de cada oligonucleótido, 0.1 µL de Taq Polimerasa 5 U/ µL y 0.5 µL de ADN templado con 30 ng / µL. Las condiciones del termociclador fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 4 min., 30 ciclos a 95°C por 40 s, 58°C por 30 s para el anillamiento de los oligonucleótidos, elongación a 72°C por 30 s y una elongación final a 72°C por 5 min. Los oligonucleótidos empleados para la reacción fueron los ST11-F (5' GCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA) y ST15-R (3'GGTAGAAAT'TCCCAGCGGGTACTG) (Thung et. al., 2018) obteniendo un producto de 381 pb. En todo proceso de PCR, se utilizó un control negativo, usando agua ultra pura y un control positivo, usando el ADN de *Salmonella* spp.

Electroforesis

Para la visualización de los productos de PCR y las extracciones de ADN se mezclaron 5 µL de producto de PCR o de extracción de ADN, con 1 µL de colorante de carga DNA Gel Loading Dye (6X) (Cat. No. R0611). Se colocaron en gel de electroforesis de agarosa al 1%, corriendo el gel en buffer 0.5X TAE a 90V, durante 50 minutos, usando un marcador de peso molecular de 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen No. Cat. 10787-018) y se usó bromuro de etidio adicionado a la agarosa para poder visualizar las bandas bajo la luz ultravioleta en fotodocumentador MiniBis Pro (DNR Bio Imaging System, Neve Yamin, Israel).

Identificación de Salmonella spp. basada en la NOM-004-SEMARNAT-2002

Esta Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones y los límites máximos permisibles de contaminantes en los lodos y biosólidos provenientes del desazolve de los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, de las plantas potabilizadoras y de las plantas de tratamiento de aguas residuales, con el fin de posibilitar su aprovechamiento o disposición final y proteger al medio ambiente y la salud humana.

Toma de muestra

Se obtuvo una muestra de lodo de una planta tratadora de aguas residuales de Cd. Obregón, Sonora. Se trasladó al laboratorio en bolsa de polietileno dentro de una hielera protegiéndola del sol. En el

laboratorio la muestra se dividió en dos, a una de ellas se le adicionó 0.1 mL de cultivo de *Salmonella* spp. (106 UFC ml⁻¹), se homogenizó y se usó como muestra problema, analizándose de inmediato.

Enriquecimiento de la muestra. Se suspendieron 4 g de muestra en 36 mL de caldo tetracionato, mezclándose por 2 min. en vórtex, hasta completar la disolución, se incubó a 37°C por 24 h. Posteriormente, se prepararon diluciones decimales seriadas, transfiriendo 1 mL de caldo tetracionato en 9 mL de agua destilada previamente estéril, y se homogenizó en vórtex por 8 s, así sucesivamente hasta obtener la dilución 10⁻⁴. Se inoculó por triplicado 1 mL en tubos de ensayo con 10 mL de caldo selenito y cistina, para cada dilución, se incubaron a 41°C por 24 h, si se observaron virado de color a naranja intenso después del tiempo de incubación, se consideran positivos.

Aislamiento e identificación presuntiva de *Salmonella* spp. Los tubos positivos, se inocularon por estrías de agotamiento en placas con agar XLD y se incubaron a 35°C por 24 h para obtener colonias aisladas. Las colonias sospechosas (coloración roja, con o sin centro negro) se resembraron en placas con ATS y se incubaron a 35°C por 24 h, posteriormente se realizó identificación molecular.

Resultados y discusión

Extracción de ADN. Este método es esencial para conseguir una muestra de ADN íntegra y pura para alcanzar datos confiables y reproducibles. Los resultados de los diferentes tipos de extracciones se muestran en la Tabla 1 y las integridades se muestran en la Figura 1.

Tabla 1.

Cuantificación de ADN.

Tipo de extracción	Ácido nucleico ng/μL
Por membranas	50.1
Por hervido	1
Por separación de fases	3

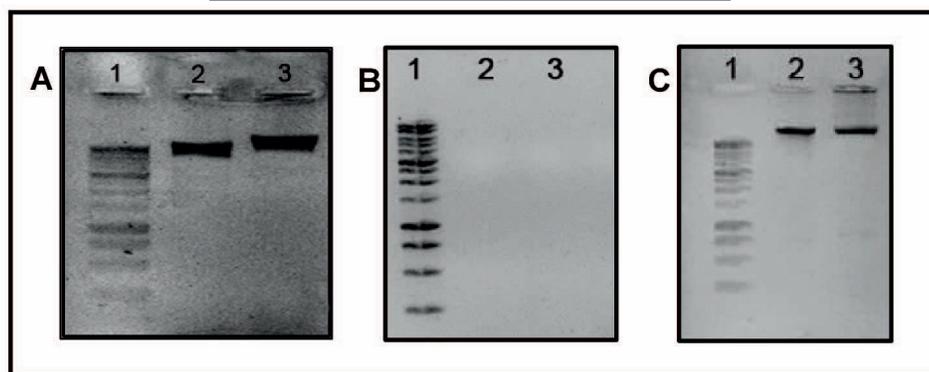


Figura 1. Gel de agarosa de 1%. Integridad de las extracciones de ADN. Carril 1. Marcador molecular 1Kb, Carril 2 y 3. ADN de *Salmonella* spp. A) Extracción por membranas, B) Extracción por hervido, C) Extracción por separación de fases.

El método más eficiente de extracción, considerando la concentración y costo fue el de separación de fases, dando resultado de concentración de ADN. Sánchez (2017), reportó resultados similares por el método de separación de fases con *Burkholderia cepacia* (Gram -), obteniendo 2.45 ng/ μ L y 3.04 ng/ μ L.

Sensibilidad de la PCR.

En la Figura 2 se muestra que el termociclador tiene la capacidad de ampliación de hasta 1002, 883 y 1084 números de copias de ADN de *Salmonella* spp., para que el equipo pueda realizar réplicas de interés de una región específica.

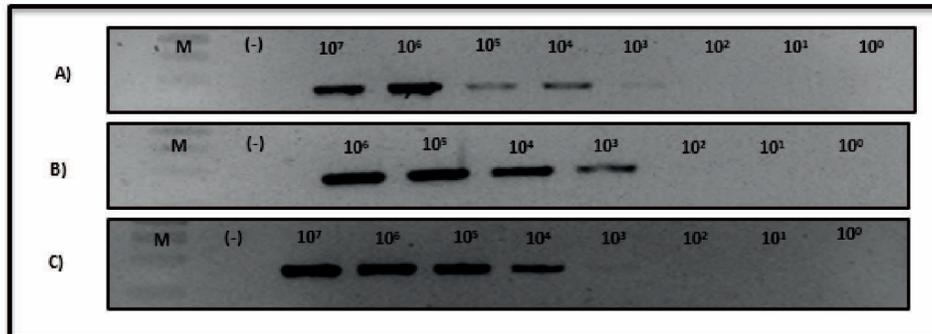


Figura 2. Resultados de la sensibilidad de la PCR con los oligonucleótidos para *Salmonella* spp. A) Repetición 1, B) Repetición 2, C) Repetición 3. M: Marcador molecular 1Kb, (-): Control negativo (agua ultra pura).

Especificidad de los oligonucleótidos. Los oligonucleótidos son específicos para la detección de *Salmonella* spp., debido a que no presentaron amplicones en cepas de *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus*. y *P. aeruginosa*, sólo para el patógeno principal de este trabajo (Figura 3), además de determinar que la mejor temperatura de anillamiento fue de 58°C.

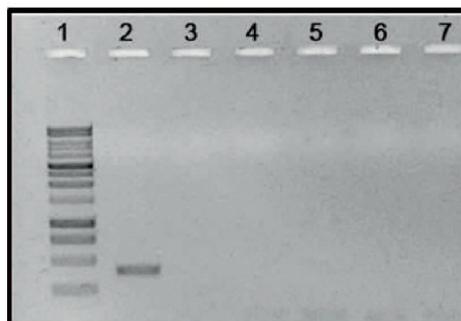


Figura 3. Resultados de la especificidad de los oligonucleótidos para *Salmonella* spp. Carril 1: Marcador molecular 1Kb, Carril 2. ADN de *Salmonella* spp., Carril 3. ADN de *L. monocytogenes*, Carril 4. ADN de *E. coli*, Carril 5. ADN de *S. aureus*. Carril 6. ADN de *P. aeruginosa* Carril 7. Control negativo (agua ultra pura)

Identificación de *Salmonella* spp. basada en la NOM-004-SEMARNAT-2002.

De las dos muestras enriquecidas que se analizaron (muestra biosólido y muestra problema), solo se detectaron el total de los tubos con caldo selenito y cistina, con vire de color a naranja en la muestra problema, considerándolos como positivos. Posteriormente se resembró una placa Petri con agar XLD por cada tubo positivo, se obtuvo colonias típicas en el total de las placas y se resembraron en ATS, para la extracción de ADN, obteniendo los resultados de cuantificación y pureza que se muestran en Tabla 2 e integridad mostrada en Figura 4.

Tabla 2.

Cuantificación y pureza de ADN extraído.

Clave	Ácido nucleico ng/μL	Relación 260/230
10-1 (a)	2.5	1.53
10-1 (b)	3	1.76
10-1 (c)	3.6	1.47
10-2 (a)	1.3	2.03
10-2 (b)	2.7	2.32
10-2 (c)	2.4	1.73
10-3 (a)	2.3	1.4
10-3 (b)	0.8	1.75
10-3 (c)	2.3	1.16
10-4 (a)	3.2	1.82
10-4 (b)	3	1.95
10-4 (c)	1.5	8.59

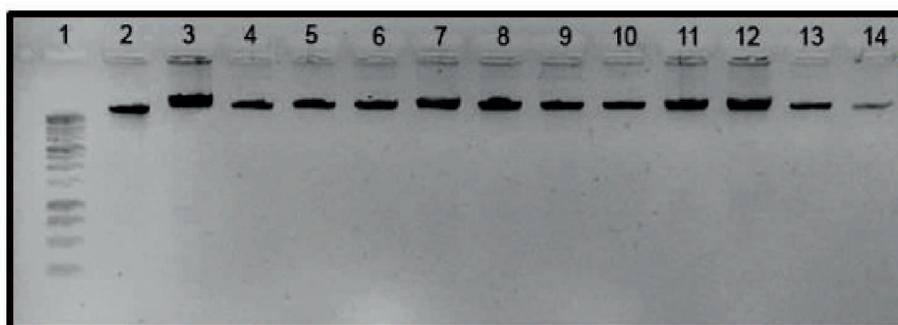


Figura 4. Integridad de la extracción de ADN de muestra problema. Gel de agarosa de 1%. Carril 1. Marcador molecular 1 kb; Carril 2. ADN *Salmonella* spp.; Carril 3. 10-1 (a); Carril 4. 10-1 (b); Carril 5. 10-1 (c); Carril 6. 10-2 (a); Carril 7. 10-2 (b); Carril 8. 10-2 (c); Carril 9. 10-3 (a); Carril 10. 10-3 (b); Carril 11. 10-3 (c); Carril 12. 10-4 (a); Carril 13. 10-4 (b); Carril 14. 10-4 (c).

Con las extracciones de ADN, se realizó la PCR obteniendo amplicones de 381 pb para el total de las diluciones como se muestra en Figura 5.

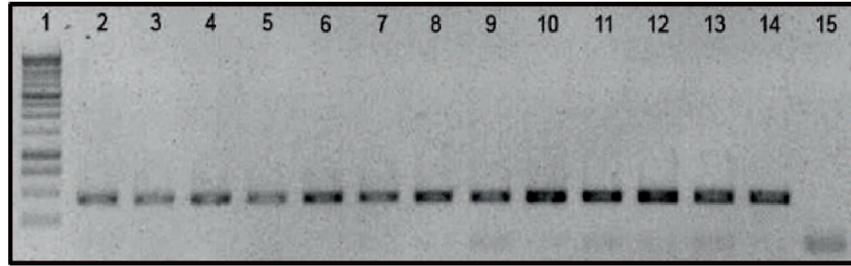


Figura 5. Resultado de la PCR de las diluciones de la muestra problema. Gel de agarosa de 1%. Carril 1. Marcador molecular 1 kb; Carril 2. Producto de PCR con ADN de *Salmonella* spp.; Carril 3. 10⁻¹ (a); Carril 4. 10⁻¹ (b); Carril 5. 10⁻¹ (c); Carril 6. 10⁻² (a); Carril 7. 10⁻² (b); Carril 8. 10⁻² (c); Carril 9. 10⁻³ (a); Carril 10. 10⁻³ (b); Carril 11. 10⁻³ (c); Carril 12. 10⁻⁴ (a); Carril 13. 10⁻⁴ (b); Carril 14. 10⁻⁴ (c); Carril 15. Control negativo (agua ultrapura).

El NMP de *Salmonella* spp. se obtuvo a partir del código compuesto por la combinación de tubos positivos en el caldo de selenito cistina, confirmados por la PCR, se compararon con la tabla del número más probable, con límite de confianza al 95% y dio como resultado mayor a 11,000 NMP/g de acuerdo a la tabla de Official Methods of Analysis of AOAC International (Horwitz, 2010). Estudio realizado por Soto-Alcocer et al. (2019) demostró la incidencia de *Salmonella* spp en muestras de biosólidos de una PTAR de la ciudad de Purísima del Rincón, Guanajuato donde se analizaron 4 muestras, y una de ella no mostró la presencia del patógeno, 2 muestras fueron <300 y solamente una tuvo 1500 de NMP/g. Por otra parte, según la NOM-004-SEMARNAT-2002 los límites máximos permisibles para poder aprovechar los biosólidos en alguna área debe tener un resultado menor a 300 NMP/g (SEMARNAT, 2002).

Conclusiones

Se determinó que el método de extracción de ADN más eficiente fue el de separación por fases, debido a que se obtienen resultados favorables a bajo costo, además se demostró la sensibilidad del termociclador realizando réplicas con poca cantidad de material genético, favoreciendo que las técnicas moleculares pueden sustituir a los métodos bioquímicos, haciendo más eficaz el proceso de identificación de *Salmonella* spp. en biosólidos.

Referencias

- Duran-Juárez, J. M., & Torres-Rodríguez, A. (2006). Los problemas del abastecimiento de agua potable en una ciudad media. *Espiral (Guadalajara)*, 12(36), 129-162.
- Feng, P., Weagant, S., & Jinneman, K. (2020). *Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 4A: Diarrheagenic Escherichia coli*. U.S. Food and Drug Administration. Recuperado 15 de mayo de 2021, de <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4a-diarrheagenic-escherichia-coli>
- Horwitz, W. (2010). *Official methods of analysis of AOAC International. Volume I, agricultural chemicals, contaminants, drugs*/edited by William Horwitz. Gaithersburg (Maryland): AOAC International, 1997.

Área Temática: **Biología**

- Qu, M., Deng, Y., Zhang, X., Liu, G., Huang, Y., Lin, C., ... & Wang, Q. (2012). Etiology of acute diarrhea due to enteropathogenic bacteria in Beijing, China. *Journal of Infection*, 65(3), 214-222
- Raeder, U., & Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1(1), 17-20.
- Rojas-Remis, R., & Mendoza-Espinosa, L. (2012). Utilización de biosólidos para la recuperación energética en México. *Producción Limpia*, 7(2), 74-94.
- Sánchez-Robalino, C. (2017). Identificación molecular del complejo *Burkholderia cepacia*, bacteria productora de antibióticos, mediante PCR en tiempo real. [Tesis de licenciatura no publicada]. Universidad Politécnica Salesiana.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002 que establece la protección ambiental, lodos y biosólidos, especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento. México, D.F.
- Soto-Alcocer, J., Rivera-Mosqueda, M., González-Ponce, M., & Ayala-Islas, A. (2019). Análisis Microbiológico de Biosólidos para su aprovechamiento en cultivos de tallo corto. *Revista de Ingeniería Biomédica y Biotecnología*. 2019. 3-7: 31-38.
- Thung, T. Y., Radu, S., Mahyudin, N. A., Rukayadi, Y., Zakaria, Z., Mazlan, N., & Wan Mohamed Radzi, C. W. (2018). Prevalence, virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serovars from retail beef in Selangor, Malaysia. *Frontiers in microbiology*, 8, 2697.

Capítulo IX.

Simulación de la hidrólisis enzimática de celulosa utilizando el software Berkeley Madonna

Simulation of the enzymatic hydrolysis of cellulose utilizing Berkeley Madonna software

Alma Marisol Badilla Ruiz,

Iram Mondaca Fernández,*

Sara Roxana Maldonado Bustamante,

José de Jesús Balderas Cortés,

María Mercedes Meza Montenegro

Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora

**Autor de correspondencia: Iram Mondaca Fernández, iram.mondaca@itson.edu.mx*

Resumen

En la actualidad se busca el desarrollo de energías renovables que permitan reemplazar el uso de combustibles fósiles, la producción de biocombustibles desarrollados a partir de biomasa lignocelulósica es una de ellas, pero la producción sostenible de estos son un desafío. Mediante la simulación de modelos matemáticos de cinética enzimática se pretende conocer mejor el proceso de hidrólisis y así poder atender esos desafíos. En este trabajo se implementó un modelo basado en la ecuación Michaelis-Menten haciendo uso del software Berkeley Madonna, teniendo como objetivo el obtener los parámetros del modelo de hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica, con el fin de validarlos para un conjunto específico de datos experimentales. Los resultados indican, mediante la validación del modelo, que este modelo fue capaz de capturar el efecto de la hidrólisis enzimática de lignocelulosa ya que se obtuvo un coeficiente de determinación mayor a 0.9 en todos los casos.

Abstract

Currently, the development of renewable energies seeks to replace the use of fossil fuels, the production of biofuels from lignocellulosic biomass is one of them, and sustainable production of biofuels is one of the greatest challenges in biorefinery. Through simulating mathematical models of enzymatic kinetics, it is intended to better understand the hydrolysis process and thus be able to address these challenges. In this work, a model based on Michaelis-Menten was implemented using the Berkeley Madonna software, aim to obtaining the parameters of the lignocellulosic biomass enzymatic hydrolysis model, in order to validate them for a specific set of experimental data. Results indicate, through the validation of the model, that this model was able to capture the effect of the enzymatic hydrolysis of

lignocelulose since a coefficient of determination greater than 0.9 was obtained in all cases.

PALABRAS CLAVE: Biomasa lignocelulósica, hidrólisis enzimática, modelo cinético.

Introducción

En los últimos años la demanda energética a nivel mundial ha aumentado, esto debido al crecimiento de la población y el desarrollo industrial, este aumento trae consigo el alto consumo de combustibles fósiles, los cuales son el mayor contribuyente a la huella de carbono por las emisiones de gases de efecto invernadero en la atmósfera. Debido a los problemas mencionados, y al agotamiento previsto de las fuentes fósiles, se han buscado alternativas como la obtención de energía a partir de biocombustibles de residuos orgánicos (Sánchez et al., 2017). Actualmente, las energías renovables representan aproximadamente el 18% del consumo total de energía a nivel mundial, dentro de ese porcentaje el 72.3% corresponde al uso de biomasa (WBA, 2018).

La producción sostenible de bioetanol a partir de materiales de biomasa lignocelulósica es uno de los mayores desafíos en la biorrefinería (Sun et al., 2016). La hidrólisis de la lignocelulosa es una etapa importante en la producción de etanol, ya que esta decide la cantidad de glucosa que será dada para la fermentación (Brodeur, 2011). Además, dicha etapa contribuye significativamente en el costo de la producción de bioetanol (Kumar y Murthy, 2011).

Los programas de modelamiento y simulación son una herramienta útil para el proceso de hidrólisis enzimática, permiten encontrar condiciones óptimas de una reacción sin necesidad de realizar experimentación, lo que ayuda en la reducción de costos. Uno de los primeros modelos matemáticos en presentarse en el área de bioprocesos fue en 1913, Leonor Michaelis y Maud Menten desarrollaron la teoría del complejo enzima-sustrato proponiendo una ecuación de velocidad que explica el comportamiento cinético de las enzimas. A partir de dicho estudio diferentes autores han desarrollado una gran cantidad de modelos aplicables a procesos biotecnológicos, entre esos trabajos se encuentran los que describen la modelación cinética en sustratos de lignocelulosa (Nidetzky et al., 1994; Shin et al., 2006; Drissen et al., 2007; Velázquez, 2017). Sin embargo, a pesar de dichos esfuerzos, el modelamiento de la cinética de la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos sigue siendo un reto para la biorrefinería. En este sentido se plantea la siguiente hipótesis: es posible obtener y validar los parámetros cinéticos de una hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica a partir de datos experimentales utilizando el software Berkeley Madonna. Y el objetivo de este trabajo es obtener los parámetros de un modelo de hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica, por medio de simulación en el programa Berkeley Madonna, con el fin de validarlos para un conjunto específico de datos experimentales.

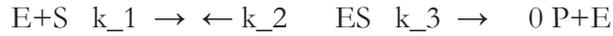
Fundamentación teórica

Biomasa lignocelulósica. La biomasa lignocelulósica es un material orgánico renovable que se encuentra abundante en la naturaleza, siendo el principal componente estructural de las plantas, está compuesta principalmente de 40-50% celulosa, 25-30% de hemicelulosa y 15-20% de lignina (Gupta et al., 2016).

Hidrólisis de lignocelulosa. La hidrólisis de la biomasa lignocelulósica se lleva a cabo por enzimas que hidrolizan los componentes de la biomasa para liberar azúcares solubles y fermentables, las principales enzimas capaces de catalizar los enlaces presentes en la lignocelulosa son las celulasas (endoglucanasas

exoglucanasa y α -glucosidasa), las hemicelulasas y ligninasas (Brethauer y Studer, 2015).

Modelo de Michaelis-Menten. Es un modelo general que explica la mayoría de las reacciones enzimáticas. Supone un mecanismo de tres pasos, en el primero ocurre una unión de enzima con el sustrato formando un complejo reversible, en el segundo paso la enzima se activa produciendo la transformación en producto, y finalmente se libera la enzima y el producto (irreversible). A continuación, se muestra la reacción general (Michaelis y Menten, 1913):



Donde, (S) sustrato, (E) enzima, (P) producto, (k1) constante de velocidad de formación, (k2) constante de velocidad de ruptura y (k3) constante de velocidad de formación de producto.

Materiales y métodos

Modelo utilizado

Se utilizó un modelo basado en Michaelis-Menten. A continuación, se presentan las ecuaciones cinéticas que describen dicho modelo, se considera la transformación del sustrato tomando como producto la formación de azúcares reductores durante la hidrólisis:

$$\begin{aligned} \frac{dC_S}{dt} &= -k_1 C_S + k_2 C_{ES} \\ \frac{dC_{ES}}{dt} &= k_1 C_S - (k_2 + k_3) C_{ES} \\ \frac{dC_P}{dt} &= k_3 C_{ES} \end{aligned}$$

Donde,

C_S es concentración de sustrato

C_{ES} es concentración de complejo enzima-sustrato

C_P es concentración del producto (azúcares reductores)

k_1, k_2, k_3 son constantes de velocidad de la reacción

Ejecución del modelo

Para la simulación del proceso de la hidrólisis enzimática se empleó el software Berkeley Madonna 10. Se realizó la programación de las ecuaciones E1, E2 y E3, utilizando parámetros con valores relativos a los vistos en bibliografía, se consideraron las siguientes condiciones iniciales cuando $t = 0$, $C_{ES}=C_P=0$ y la concentración de sustrato inicial de 50 g/L. Posteriormente se ejecutó el código (Figura 1) en el software.

```
k1=0.5
k2=2
k3=0.5

starttime=0
stoptime=70
dt=0.2

{INICIALES}
init Cs=50
init Ces=0
init Cp=0

d/dt(Cs)= -(k1*Cs)+(k2*Ces)
d/dt(Ces)=k1*Cs-(k2+k3)*Ces
d/dt(Cp)= k3*Ces
```

Figura 1. Código del modelo inicial.

Obtención de parámetros ajustados

Posterior a la ejecución del modelo inicial, se realizaron las corridas experimentales, ajustando la curva del modelo original junto con los valores experimentales obtenidos de los autores Makarova et al. (2017), Castillo-Saldarriaga y Velásquez-Lozano (2019) y Madhusmita (2017), aplicando las condiciones iniciales de concentración de sustrato correspondiente a cada autor. Se obtuvieron así, los parámetros ajustados del modelo, los cuales se aplicaron a los códigos y se ejecutaron en el software para su simulación y obtención de valores predichos.

Validación del modelo

Para la validación del modelo, los resultados obtenidos (valores predichos de azúcares reductores) de la simulación de cada caso experimental se compararon con los datos experimentales de 3 autores mencionados anteriormente. Para cuantificar el ajuste entre los datos experimentales y los datos de la simulación del modelo se utilizó el coeficiente de determinación (R^2), el cual se calculó mediante Microsoft Excel.

Resultados y discusión

Ejecución del Modelo

La Figura 2 ilustra la gráfica de los resultados del modelamiento de las ecuaciones E1, E2 y E3 en el programa Berkeley Madonna, con las condiciones de la Figura 1. En la Figura 2, se observa un decremento en los valores de las concentraciones del sustrato y un incremento en la concentración del producto, esto es un comportamiento típico de la conversión de los materiales lignocelulósicos a azúcares reductores durante la acción de enzimas celulolíticas.

La biomasa lignocelulósica contiene celulosa, hemicelulosa, lignina y algunos otros componentes que, al actuar las enzimas, estas van hidrolizando el sustrato, por lo que podemos observar en la gráfica un decremento, y se comienzan a liberar glucosa y otros azúcares reductores (Bhaumik y Laxmikant, 2015). Además, en la Figura 2 podemos observar el comportamiento de la concentración de complejos enzima-sustrato (ES). Al inicio de la hidrólisis las moléculas de sustrato se encuentran libres al igual que las enzimas, hasta que, en un momento dado, estas moléculas se combinan con la enzima y forman un complejo ES y estos posteriormente se transforman en un producto. Lo anterior describe el comportamiento de la gráfica, al iniciar la reacción de formación del complejo ES la concentración aumenta y se reduce al ir aumentando la formación del producto final (azúcares reductores) (Rodwell et al., 2018).

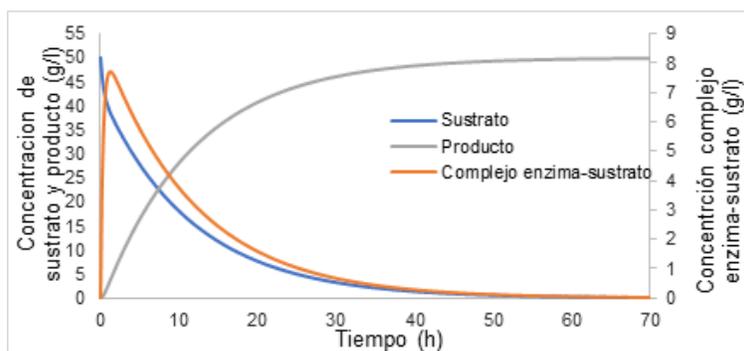


Figura 2. Simulación de la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica, gráfica obtenida del programa Berkeley Madonna.

Obtención de parámetros ajustados

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos al ajustar la curva del modelo original con los valores experimentales.

Tabla 1.

Valores de los parámetros ajustados para cada corrida experimental.

Parámetros	Valores		
	Makarova et al.	Castillo-Saldarriaga y Velásquez-Lozano	Madhusmita
Tiempo (h)	72	48	84
C _s inicial (g/L)	30	50	50
k ₁ (h ⁻¹)	0.18624	1.5645	1.46769
k ₍₂₎ (g /L h)	11.80732	12.2571	12.35656
k ₃ (g /L h)	1.94245	0.10982	0.11095

Simulaciones de los modelos ajustados

La Figura 3 muestra las gráficas resultantes de la simulación de los modelos ajustados para cada corrida experimental. Se puede observar que el comportamiento de la concentración de azúcares reductores mantiene el mismo sentido que lo descrito anteriormente en el resultado de la ejecución del modelo original. Los puntos en las gráficas indican el tiempo y los valores predichos, los cuales fueron utilizados posteriormente para la validación del modelo.

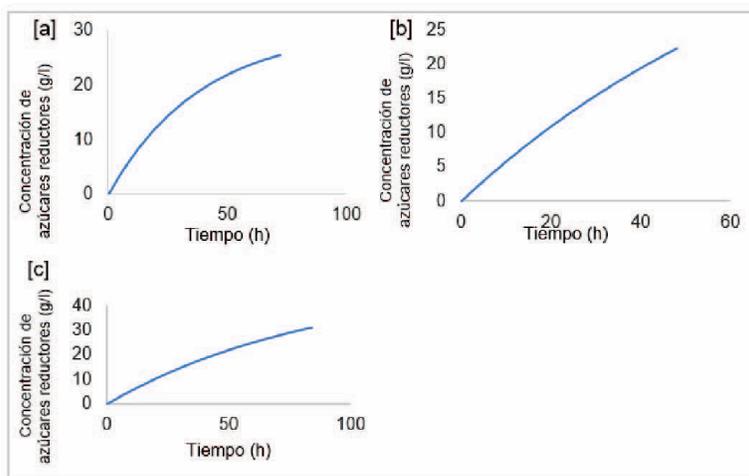


Figura 3. Simulación del modelo ajustado con datos de: a. Makarova et al. (2017), b. Castillo-Saldarriaga y Velásquez-Lozano (2019), c. Madhusmita (2017). Concentración de los azúcares reductores contra el tiempo de la hidrólisis enzimática.

Validación del modelo

El modelo se validó mediante la comparación de datos predichos de azúcares reductores de la simulación contra datos experimentales de azúcares reductores, y los coeficientes de determinación (R^2) resultantes para cada caso se muestran en la Figura 4.

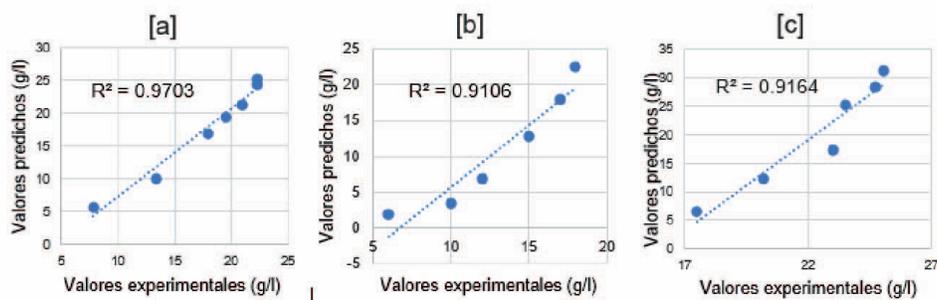


Figura 4. Validación del modelo. R^2 de datos predichos de azúcares reductores contra datos experimentales de concentración de azúcares reductores de: a. Makarova (2017), b. Castillo y Velásquez (2019), c. Madhusmita et al, (2017).

Al obtenerse resultados del valor de R^2 por encima de 0.9, se puede decir que, la coincidencia cuantitativa de las simulaciones del modelo con los datos experimentales indica que este modelo fue capaz de capturar el efecto de la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica para cada caso, considerando la complejidad de cada sustrato.

Conclusiones

El programa Berkeley Madonna permitió simular de manera fácil y completa las ecuaciones del modelo seleccionado para la hidrólisis enzimática de celulosa. Además, permitió realizar el ajuste de las curvas con los datos experimentales y el modelo original, obteniéndose los parámetros ajustados para cada caso de hidrólisis enzimática. El modelo seleccionado, basado en el principio de Michaelis-Menten, nos permite obtener resultados relativos a los presentados por diferentes autores, además su ajuste con datos experimentales resultó en un valor de R^2 mayor a 0.9, lo que indica que es un modelo aplicable a sustratos complejos.

Referencias

- Bhaumik, P. y Laxmikant, P. (2015). Chapter 1: Conversion of Biomass into Sugars, En: Biomass Sugars for Non-Fuel Applications, 1-53.
- Brethauer, S. y Studer, M. (2015). Biochemical conversion processes of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals: A review. CHIMIA, 69, 572-581.
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. y Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. Enzyme Res, 2011.

Área Temática: Biotecnología

- Castillo-Saldarriaga y Velásquez-Lozano. (2019). Producción de etanol empleando *Panicum maximun* pretratado: efecto de altas concentraciones de sólidos en la hidrólisis enzimática y fermentación de hidrólizados. *Ingeniare*, 27.
- Drissen, E., Maas H., Maarel, M., Kabel, A., Schols, A., Tramper, J... (2007). A generic model for glucose production from various cellulose sources by a commercial cellulase complex. *Biocatalysis and Biotransformation*, 25, 419-429.
- Gupta, V., Kubicek, C., Berrin, J., Wilson, D., Couturier, M., Berlin, A., Filho, E. y Ezeji, T. (2016). Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. *Trends in Biochemical Sciences*, 20, 1-13.
- Kumar, D. y Murthy, G. (2011). Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy in cellulosic ethanol production. *Biotechnol Biofuels*, 4.
- Madhusmita, D. (2017). Dilute acid and ionic liquid based pretreatment of lignocellulosic biomass towards fermentable sugars. Tesis de doctorado. Indian Institute of Technology Guwahati, Assam, India.
- Makarova, E., Budaeva, V., Kukhlenko, A. y Orlov, S. (2017). Enzyme kinetics of cellulose hydrolysis of *Miscanthus* and oat hulls. *Biotech*, 7, 3-9.
- Michaelis, L. y Menten, M. (1913). Die kinetic invertinwirkung. *Biochem. Zeitsch*, 49, 333-369.
- Nidetzky, B., Steiner, W., Hayn, M. y Claeysens, M. (1994). Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochem J*. 298, 705-710.
- Rodwell, V. (2018). *Harper Bioquímica Ilustrada*. (31). Mc Graw Hill Education.
- Sánchez, L., Pérez, R. y Vásquez, C. (2017). Eficiencia de países desarrollados en el control del uso de combustibles fósiles para generar energía. *Ecociencia*, 4, 58-71.
- Shin, D., Yoo, A., Kim, S. y Yang, D. (2006). Cybernetic modeling of simultaneous saccharification and fermentation for ethanol production from steam-exploded wood with *Brettanomyces custersii*. *J Microbiol Biotechn*, 16, 1355-1361
- Sun, S., Cao, X. y Sun, R. (2016). The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials: a review. *Bioresour Technol* 199, 49-58.
- Velázquez, L. (2017). Simulación del proceso de hidrólisis enzimática a partir de bagazo de sorgo dulce para la producción de bioetanol de segunda generación utilizando Aspen Hysys. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba.
- WBA, (2018). WBA Global bioenergy statistics 2018, Summary Report. World Bioenergy Association, www.worldenergy.org

Capítulo X.

Simulación de un proceso de fermentación en modalidad batch con aireación

Simulation of an aerobic batch fermentation

*Alexa Myleva Rubio Bojórquez,
Iram Mondaca Fernández*,
María Rita Moreno García,
María Mercedes Meza Montenegro,
José de Jesús Balderas Cortés
Instituto Tecnológico de Sonora*

**Autor de correspondencia: iram.mondaca@itson.edu.mx*

Resumen

Se realizó una simulación de un proceso de fermentación aerobia y se analizó el efecto de la modificación en la velocidad de agitación y la tasa de aireación, las cuales tienen influencia sobre el nivel de oxígeno disuelto presente en el reactor, con el objetivo de aumentar el nivel de oxígeno disuelto a una concentración mínima de 2 ppm. Se encontró que con el aumento de estas variables se obtiene un mayor nivel de oxígeno disponible para el crecimiento.

Abstract

A simulation was used for the modelling of an aerobic batch fermentation in an aerated reactor, where the physical variables of the process implied in the oxygen level received by the culture were identified and modified to find a solution to a theoretical problem, in which a dissolved oxygen level of 2 ppm should be met as a requirement for the cell growth. It was found that increasing the aeration rate and stirring speed, the oxygen level also increases to meet the demand required, obtaining more bioavailable oxygen for the growth of microorganisms.

PALABRAS CLAVE: Aireación, agitación, cultivo batch, modelado matemático, bioprocesos,

Introducción

En un reactor aireado, el suministro de oxígeno de la fase gaseosa al microorganismo puede ser el factor limitante en términos de productividad. Por lo tanto, la transferencia de masa gas – líquido y líquido – sólido (organismo) tiene un papel importante en el diseño y operación de la mayoría de los procesos

aerobios (Perlman, 2014). Normalmente, el oxígeno necesario en un bioproceso es suministrado en forma de aire, la fuente con mayor disponibilidad y más económica del gas. La demanda de oxígeno se satisface mediante la aireación y agitación del medio de cultivo dentro del reactor, por lo que estos parámetros son esenciales en la determinación de la biodisponibilidad del oxígeno en el medio y para el diseño y operación de muchos bioprocursos (Perlman, 2014; Stanbury et al., 2017). En materia de bioprocursos, el uso de modelos es clave para entender los mecanismos de acción que tienen lugar en un proceso biológico, además de ser una herramienta útil para optimizar y diseñar procesos y equipos (Martín-Lara & Ronda, 2020); otra de las aplicaciones que se le pueden dar a este tipo de herramientas es la que va dirigida a la enseñanza. Las habilidades obtenidas mediante este método de enseñanza son valiosas en el diseño de nuevos experimentos, la obtención de datos cinéticos a partir de otros experimentos, en el diseño y optimización de sistemas de reacciones biológicas, así como en el desarrollo de estrategias útiles en el control de biorreactores (Heinzle et al., 2021).

El origen de este trabajo está en la problemática del aprendizaje remoto debido a la contingencia por la pandemia de COVID-19, ya que al tratarse de asignaturas completamente prácticas que siempre se han llevado a cabo en un laboratorio, se necesitó encontrar nuevas herramientas que permitieran a los estudiantes seguir avanzando con su aprendizaje sin comprometer la calidad de éste. En este aspecto, el uso de los modelos matemáticos permitió a los estudiantes abordar los mismos procesos que se han realizado en laboratorios, de una forma más analítica, revisando los aspectos numéricos que, en muchas ocasiones, como parte de un ambiente científico, pueden llegar a pasar desapercibidos.

En este trabajo se realizó una simulación de un proceso de fermentación aerobia donde se aplica un inóculo de levadura para la producción de biomasa y se analizó el efecto de la modificación en la velocidad de agitación y la tasa de aireación, las cuales tienen influencia sobre el nivel de oxígeno disuelto presente en el reactor, con el objetivo de aumentar el nivel de oxígeno disuelto a una concentración mínima de 2 ppm, que es el nivel crítico del microorganismo a producir, ya que con un nivel menor, la levadura tiende a pasar por el proceso de fermentación alcohólica y se reduce el rendimiento de biomasa, que es el efecto contrario al que se busca en el proceso de producción de biomasa (Estela-Escalante et al., 2012).

Materiales y métodos

Se ingresó en el software Berkeley Madonna un código diseñado por el Dr. Iram Mondaca Fernández, basado en la información encontrada en el libro *Biological Reaction Engineering*, en el cual se describen las ecuaciones utilizadas, así como el principio mediante el cual el software realiza los cálculos (Dunn et al., 1992). En el código se colocaron datos iniciales de sustrato, biomasa y concentración de oxígeno, rendimiento de biomasa/sustrato (Y_x/s), aireación (G), agitación (N), concentración de oxígeno en la saturación (CL_S), tasa de consumo de oxígeno (qO), y con los parámetros necesarios de tiempo y tamaño de paso ($dt = 0.025$) necesarios para el análisis de datos mediante el método numérico de Runge – Kutta de orden 4. Se corrió el programa y se obtuvo la cinética de fermentación. Se realizaron incrementos en los parámetros de Y_x/s , N , G y qO , y se reportaron los cambios en la concentración de biomasa (x), nivel de oxígeno (CL) y tiempo de proceso (t) ocasionados por el cambio en cada uno de los parámetros. Después, se corrió otro programa de fermentación en batch con aireación, con nuevos valores para cada parámetro y se modificaron los parámetros para encontrar las condiciones a las cuales la biomasa tuviera la concentración de oxígeno

mínima, o nivel crítico necesario por las células, que en esta simulación se planteó de 2 ppm.

Para describir la cinética de crecimiento microbiano se utilizó el modelo de Monod. La ecuación 1 describe el balance de biomasa (x), la ecuación 2 describe la tasa de crecimiento microbiano (rx), la ecuación 3 describe el balance del sustrato (s) y la ecuación 4 describe la tasa de consumo de sustrato (rs), que está dada en función del rendimiento biomasa/sustrato (y) y de la tasa de crecimiento de la biomasa (rx).

Ecuación 1

$$\frac{d}{dt}(x) = rx$$

Ecuación 2

$$rx = \mu x$$

Ecuación 3

$$\frac{d}{dt}(s) = rs$$

Ecuación 4

$$rs = -rx/y$$

La ecuación 5 es la ecuación de Monod adaptada al sistema, la cual relaciona el modelo de crecimiento microbiano con el nivel de oxígeno en el reactor.

Ecuación 5

$$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s} x \frac{CL}{k_{cl} + CL}$$

Para determinar CL y resolver la problemática planteada, se utilizó la ecuación 6, con la cual se describió el comportamiento del nivel de oxígeno, donde CL es el nivel de oxígeno disuelto, KLA es la constante de transferencia de masa, qO2 es el consumo microbiano de oxígeno y X es la concentración de biomasa.

Ecuación 6.

$$\frac{d}{dt}(CL) = kLa \frac{CLS - CL}{qO_2 * X}$$

Para el cálculo de la KLA se utilizó la siguiente ecuación:

Ecuación 7.

$$kLa = KN^3G^{0.5}$$

Donde K es el coeficiente específico de transferencia de masa, N es la velocidad de agitación y G la tasa de aireación.

Resultados y discusión

Mediante las ecuaciones utilizadas y el tamaño de paso, con un tiempo de paro de 60 h, el software realizó 2400 cálculos en un tiempo de 0.002 segundos.

En la Figura 1 se observa el resultado de la simulación con los parámetros originales. Se observó un tiempo de proceso de 36.625 h (eje x en el gráfico), una concentración de biomasa de 6.7 g/L (representada por la línea en color azul) y un nivel de O2 de 0.323 ppm (representado por la línea color amarillo, CL); el consumo de sustrato está representado por la línea azul en el gráfico, y una vez que se consumió en su totalidad se consideró el proceso terminado. El nivel de oxígeno calculado indica

que es necesario un ajuste en las variables, para aumentar el coeficiente volumétrico de transferencia de masa, y consecuentemente, el nivel de oxígeno. Las características del proceso y los microorganismos utilizados indican que la demanda de oxígeno es de 2 ppm, por lo que es necesario ajustar los parámetros para cumplir con dicha demanda, que es un requerimiento mínimo para que se lleve a cabo el proceso.

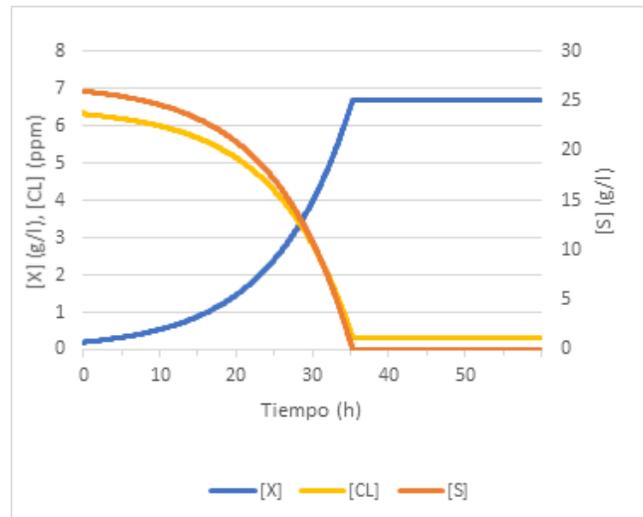


Figura 1. Gráfico obtenido al introducir los datos obtenidos en la simulación utilizando el código original. La línea azul representa el crecimiento microbiano, la línea naranja el consumo del sustrato y la línea amarilla el nivel de oxígeno en el reactor.

Para obtener la demanda mínima de oxígeno requerida por las células, se aumentaron los parámetros de agitación y tasa de aireación, que son los principales involucrados en el nivel de oxígeno disponible para las células. Como se observa en la Tabla 1, se obtuvo el valor requerido al aumentar la velocidad de agitación de 26000 rev/h a 29000 rev/h y la tasa de aireación de 60 m³/h a 114 m³/h.

Tabla 1. Modificaciones realizadas en los parámetros del proceso y resultados obtenidos.

Modificación	Tiempo de proceso (h)	Biomasa (g/L)	Nivel de oxígeno (ppm)
N = 29000 rev/h	37.5	6.7	2.048
G = 114 m ³ /h	37.5	6.7	2.018

Para obtener el valor al cual aumentar la variable, se hizo uso de la herramienta de sliders incluida en el software, mediante la cual se pueden utilizar barras deslizables para modificar el valor de las variables que se definan. En este caso se utilizaron sliders para las variables de agitación y aireación y se probó aumentando los valores poco a poco hasta que se alcanzó el nivel de oxígeno de 2 ppm. En la Figura 2 se observa el gráfico obtenido al incrementar la variable de velocidad de agitación.

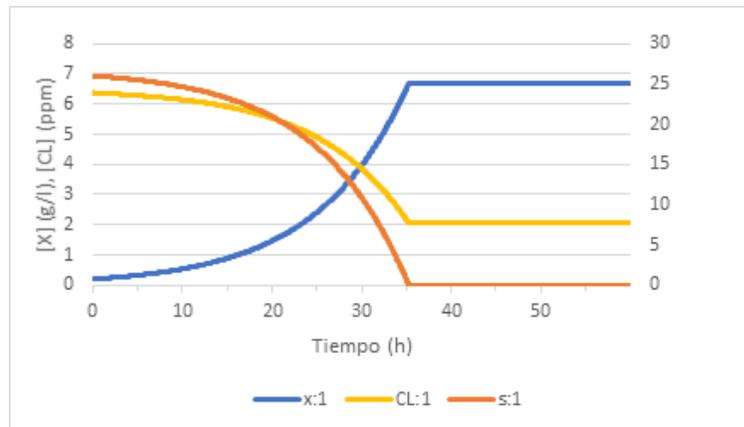


Figura 2. Gráfico obtenido después de aumentar la velocidad de agitación de $N = 26000$ rev/h a $N = 29000$ rev/h, para obtener un CL (línea amarilla) de 2 ppm.

En la Figura 3 se observa el gráfico representativo del proceso obtenido al aumentar la tasa de aireación de 60 a 114 m³/h. En las Figuras 1 y 2 se observa como la velocidad de agitación y la tasa de aireación afectan el nivel de oxígeno, y cómo se pueden manipular para obtener el deseado tan solo con el uso del software, cuando en un proceso real se deben realizar numerosas pruebas con distintos valores en los parámetros para encontrar la mejor opción.

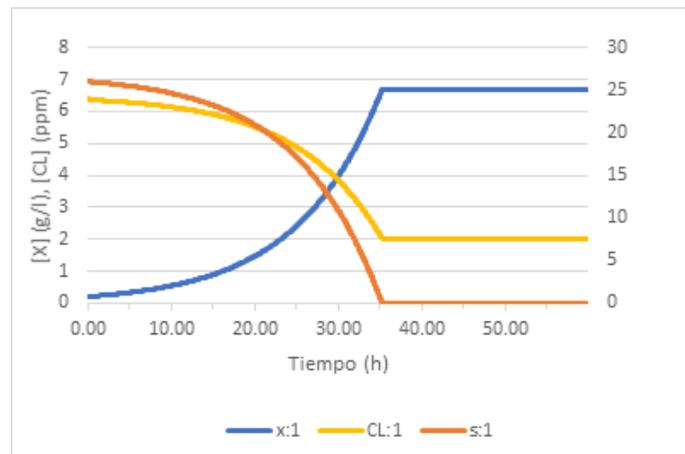


Figura 3. Gráfico obtenido después de aumentar la tasa de aireación de $G = 60$ m³/h a $G = 114$ m³/h, para obtener un CL de 2 ppm.

En acuerdo con los resultados mostrados en las Figuras 2 y 3, tanto la modificación de la velocidad de agitación como de la tasa de aireación proveen las condiciones necesarias para obtener una concentración de oxígeno disuelto de 2 ppm en el proceso. La decisión de cuál variable se deberá modificar puede estar basada en el costo de cada modificación, ya que se conoce que el resultado será el mismo. Estela-Escalante et al. revisaron el efecto de la aireación en la capacidad fermentativa de una cepa de levadura en jugo de manzana, y encontraron, en concordancia con los resultados obtenidos en la simulación de este trabajo, que las condiciones aerobias en el proceso de fermentación de la levadura

promueven el crecimiento celular, y que una mejor disponibilidad de oxígeno puede lograrse mediante la agitación.

Tanto el crecimiento del microorganismo como el consumo de oxígeno dependen de la tasa de aireación y la velocidad de agitación del reactor donde se produce la fermentación (Amicarelli et al., 2008). Y de acuerdo con Torres López et al. (2008), se requiere de un suministro adecuado de oxígeno para que se puedan satisfacer los requerimientos metabólicos de los microorganismos en un proceso de fermentación aerobia. La demanda de oxígeno está dada por la oxidación de la fuente de carbono y su transformación en células, productos y CO₂, y esta se debe satisfacer mediante la aireación y el mezclado del cultivo, el cual se logra mediante la agitación, ya que el oxígeno actúa como receptor final en las reacciones de oxidación que se llevan a cabo en la respiración aeróbica.

La concentración de oxígeno disuelto presente en un cultivo aerobio depende de la tasa de transferencia de oxígeno gas – líquido, de la velocidad de transporte de este hacia las células y del consumo microbiano de oxígeno (Buitrago et al., 2013). La aireación provee las burbujas de aire en las cuales se encuentra el oxígeno necesario para la célula, mientras que la agitación permite una distribución homogénea de las burbujas, así como un menor tamaño de estas, que permite una mayor área de contacto y por ende una mayor transferencia de oxígeno. Por lo tanto, para mantener una tasa de transferencia de oxígeno óptima para una alta densidad celular, comúnmente se recurre a una velocidad alta de agitación o a una alta tasa de aireación, ya que estas condiciones ofrecen, además de una mayor superficie de contacto, una mayor fuerza impulsora y un mayor tiempo de residencia de las burbujas de aire, lo que favorece la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa al líquido (Huang & Tang, 2007).

Conclusiones

En este particular proceso, se demostró mediante la simulación del proceso que los parámetros de velocidad de agitación y flujo de aireación influyen directamente en el valor de la constante de transferencia de oxígeno K_La, que afecta también la cantidad de oxígeno disuelto en el medio. Si se tiene una agitación y una aireación óptimas se puede lograr una mayor disponibilidad de oxígeno para el crecimiento celular.

Se utilizó el software de modelado Berkeley Madonna exitosamente para obtener una representación de un proceso real, y probó ser una herramienta útil en el campo de la enseñanza, en un panorama global en el que los estudiantes dependen cada vez más de sí mismos para su aprendizaje. Esta propuesta no solo es útil en el ámbito de la enseñanza, sino también en el modelado, escalamiento y optimización de procesos reales, lo cual permite una reducción en las pruebas de laboratorio que se deben realizar, y por ende, presentan una ventaja económica y técnica sobre métodos más convencionales.

Referencias

- Amicarelli, A., Toibero, J. M., Quintero, O., di Sciascio, F., & Carelli, R. (2008). Control de oxígeno disuelto para fermentación batch de bt. In *Semana Del Control Automático XXI Congreso Argentino De Control Automático*, Buenos Aires, Argentina.
- Buitrago, G., Otálvaro, Á. M., & Duarte, P. G. (2013). Evaluación de la transferencia de oxígeno en un biorreactor convencional con aireador externo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 106-114.

Área Temática: **Biotecnología**

- Dunn, I. J., Ingham, J., Heinzle, E., & Prenosil, J. E. (1992). *Biological Reaction Engineering*. Weinheim: VCH.
- Estela-Escalante, W., Rychtera, M., Melzoch, K., & Hatta-Sakoda, B. (2012). Effect of aeration on the fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae* cultured in apple juice. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(2), 211-226.
- Heinzle, E., Dunn, I. J., Ingham, J., & Přenosil, J. E. (2021). *Biological Reaction Engineering: Dynamic Modeling Fundamentals with 80 Interactive Simulation Examples*. John Wiley & Sons.
- Huang, W. C., & Tang, I. C. (2007). Bacterial and Yeast Cultures—Process Characteristics, Products, and Applications. *Bioprocessing for value-added products from renewable resources*, 185-223.
- Martín-Lara, M., & Ronda, A. (2020). Implementation of Modeling Tools for Teaching Biorefinery (Focused on Bioethanol Production) in Biochemical Engineering Courses: Dynamic Modeling of Batch, Semi-Batch, and Continuous Well-Stirred Bioreactors. *Energies*, 13(21), 5772.
- Perlman, D. (Ed.). (2014). *Annual reports on fermentation processes*. Elsevier.
- Stanbury, PF, Whitaker, A. y Hall, SJ (2017). *Principios de la tecnología de fermentación*. USA: Elsevier Science.
- Torres López, A. M., Quintero Díaz, J. C., & Atehortúa Garcés, L. (2008). Determination of the specific oxygen uptake rate in microorganisms including electrode time response. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, (43), 33-41.

Capítulo XI.

Modelo matemático y estimación de parámetros cinéticos para un biorreactor Airlift de tubos concéntricos

Mathematical model and estimation of kinetic parameters for a concentric tube Airlift bioreactor

A.G. Hernández¹,

M. A. Martínez Trujillo¹,

M. R. Cruz Díaz^{1,2}

¹División de Ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec

²Departamento de Ingeniería y Tecnología, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-Campo Uno,

Universidad Nacional Autónoma de México

**Autor de correspondencia: cdmrmartin@hotmail.com*

Resumen

[]

El presente trabajo tuvo como objetivo describir los cambios transientes (X, S, P, O_{2,g}, O_{2,d}) de la producción de pectinasas por *Aspergillus flavipes* FP-500 en un biorreactor Airlift de tubo concéntrico (BALTC, 10L de capacidad) en modo intermitente con recirculación mediante un modelo matemático por secciones de N-tanques en serie (MNTS). Para ello, se incorporaron los parámetros correspondientes a la caracterización hidrodinámica (eg, er, ed, Dax, ULr, UGr), las relaciones geométricas características (Ar, Ad, Dr, Dc, Hc, V), los coeficientes de transferencia de masa (KLar, KLad) y los parámetros cinéticos (μ_{max} , KS, KCL, YXS, α y β) en el modelo matemático del biorreactor. El modelo propuesto, con 5 y 4 etapas en serie en el riser y en el downcomer, respectivamente, describe adecuadamente la evolución del cultivo sumergido de *Aspergillus flavipes* FP-500 para la producción de pectinasas utilizando cáscara de limón como fuente de carbono y energía.

PALABRAS CLAVE: Biorreactor Airlift; Cáscara de limón, Producción de pectinasa; Oxígeno disuelto; Modelado de N-tanques en serie.

Introducción

Los biorreactores Airlift son tanques verticales que permiten un mezclado de las especies bajo un principio neumático. Funcionan a partir de la inyección de una corriente gaseosa (aire) que provoca una

turbulencia en la fase líquida, necesaria para favorecer la circulación y el mezclado de las fases. Esto favorece la transferencia de sustancias gaseosas hacia la fase líquida, como el O_2 ,g presente en el aire, indispensable para el metabolismo microbiano en fermentaciones aerobias (Guieysse, et al., 2011). Los reactores Airlift tienen como características principales, en comparación con los reactores de tanque agitado, un bajo consumo de energía y menor esfuerzo de corte, lo que evita el daño celular (Znad et al., 2004).

Por otro lado, las dimensiones del reactor, específicamente la relación altura-diámetro (H/D), pueden determinar la forma en que sucede la transferencia de masa dentro del sistema. A medida que estas dimensiones aumentan, resulta más difícil medir y analizar las especies que intervienen en el desarrollo de un cultivo, como es el caso del oxígeno disuelto, y la manera como este nutriente se distribuye a lo largo del tanque. Por lo tanto, para tener una descripción del funcionamiento de los BALTC y su impacto en el desarrollo de un cultivo, se requiere del uso de modelos matemáticos.

Una descripción matemática precisa del funcionamiento de los biorreactores Airlift es una tarea complicada. Se requiere de herramientas de dinámica de fluido computacional (CFD, por sus siglas en inglés). Estas utilizan enfoques de modelos Eulerianos o Lagrangianos o su combinación para resolver las ecuaciones de variación de la velocidad y transporte de masa entre las fases (Pawar, 2018; Neviani et al., 2021). Otra opción es utilizar modelos simplificados; dado que el mezclado de las fases en el BALTC suele ser imperfecto, los modelos de dispersión axial (MDA) o el modelo de N-tanques en serie (MNTS) podrían describir satisfactoriamente el patrón de flujo dentro del BALTC (Sikula y Markoš, 2007; Znad et al., 2004). El MDA es un conjunto de ecuaciones diferenciales parciales y condiciones de frontera que se resuelven mediante técnicas numéricas complicadas. Por otro lado, el MNTS utilizado en este trabajo, constituye un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias con condiciones iniciales, las cuales se pueden resolver relativamente de forma sencilla.

Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue implementar un modelo matemático por secciones de N-tanques en serie (MNTS) para describir los cambios transientes (X, S, P, O_2 ,g, O_2 ,d,) de la producción de pectinasas por *Aspergillus flavipes* FP-500 utilizando cáscara de limón como fuente de carbono y energía en un BALTC (10L de capacidad) en modo intermitente con recirculación.

Materiales y métodos

El modelo MNTS sugiere que el diseño correcto de un BALTC se basa en la suma de los elementos en las secciones que dividen a cada sección del reactor (Figura 1). En este modelo se considera que en el riser y el downcomer existen una serie de tanques agitados bien mezclados y de igual tamaño; en tanto que la corona, por su volumen y dimensiones, es considerada como un solo tanque perfectamente mezclado (Behin, 2010) y que cada sección tiene un patrón de flujo característico, por lo que sugiere que el mezclado en el BALTC es imperfecto (Znad et al., 2004; Nandi, 2010).

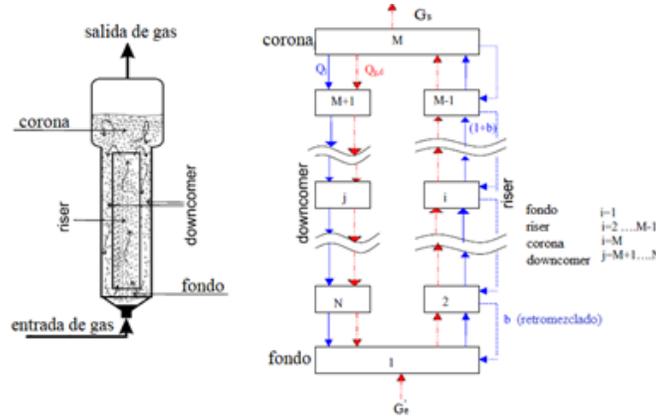


Figura 1. Representación gráfica Modelo N-Tanques en Serie para un Reactor Airlift. (Sikula et al., 2007).

Ecuaciones de la caracterización hidrodinámica

De acuerdo a Znad et al. (2004), el número de etapas en las que se pueden dividir el riser y el downcomer se ajusta en función del grado de dispersión axial (D_{ax}), y se calcula como se indica en la ecuación (1):

$$N = Pe(b + 1/2) \tag{1}$$

Donde N es el número de etapas de la sección, Pe es el número de Peclet y b es el flujo de retromezclado entre etapas. Cuando b es igual a 0, entonces el número de etapas se define de acuerdo con la ecuación (2):

$$N = Pe/2 \tag{2}$$

El número de Peclet está definido por la ecuación (3):

$$Pe = (VI_{(r,d)} * h_D) / D_{ax} \tag{3}$$

donde D_{ax} es el coeficiente de dispersión axial (m^2/s), y se calcula a partir de la ecuación (4):

$$D_{ax} = 2.6 D_r^{1.5} U_{gr}^{0.5} \tag{4}$$

Donde D_r es el diámetro del riser y U_{gr} es la velocidad superficial del gas en el riser.

Por otro lado, la altura de la dispersión (h_D , en m) está definida por la ecuación (5):

$$h_D = h_L / (1 - \epsilon_g) \tag{5}$$

h_L es la altura de la fase líquida libre de gas (m) y ϵ_g corresponde al holdup del gas global; y se define de acuerdo con la ecuación (6):

$$\epsilon_g = (A_r \epsilon_r + A_d \epsilon_d) / (A_r + A_d) \tag{6}$$

donde A_r (m^2) es el área transversal del riser, A_d (m^2) es el área transversal del downcomer, ϵ_r es el holdup en el riser y ϵ_d es el holdup en el downcomer. Los valores de holdup están definidos por las ecuaciones (7) y (8) (Bello et al., 1985):

$$\epsilon_r = 0.16 (U_{gr} / U_{Lr})^{0.57} (1 + A_d) / A_r \tag{7}$$

$$\epsilon_d = 0.89 (\epsilon_r) \tag{8}$$

donde: U_{Lr} es la velocidad superficial del líquido en el riser (m/s), y U_{gr} es la velocidad superficial del gas en el riser (m/s).

La velocidad lineal de la fase líquida V_L (m/s) en el riser (r) o en el downcomer (d), se calculan a partir de las ecuaciones de velocidad superficiales correspondientes:

$$Vlr=ULr/(1-\epsilon_r) \quad (9)$$

$$Vlr(1-\epsilon_r)Ar=Vld(1-\epsilon_d)Ad \quad (1)$$

$$Vld=Vlr(1-\epsilon_r)Ar/(1-\epsilon_d)Ad \quad (11)$$

El conjunto de ecuaciones (1 a 11) permite desarrollar la caracterización hidrodinámica del reactor. Hay que recordar que, además de la hidrodinámica del reactor, el fenómeno de transferencia de masa también depende de las propiedades reológicas del caldo de cultivo, que varían conforme se desarrolla el proceso (Doran, 1995).

Modelo cinético

Las expresiones cinéticas para la biomasa, sustrato, oxígeno y productos (endo y exo pectinasas) en un cultivo por lotes se representan por un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias (12 a 16) dependientes del tiempo (Nuñez, 2014), que sugieren que el crecimiento microbiano de *A. flavipes* (x) depende de la pectina (S) y el oxígeno disuelto (O_{2,d}) (Gómez Sánchez et al., 2012), por lo que la μ se expresa como una ecuación de doble Monod; y que la formación del producto está parcialmente asociada al crecimiento:

$$\text{Producción de biomasa (x):} \quad \frac{dx}{dt} = \mu \max \left(\frac{S}{K_S+S}, \left(\frac{O_{2,d}}{K_{O_{2,d}}+O_{2,d}} \right) \right) x \quad (12)$$

$$\text{Consumo de sustrato (S):} \quad \frac{ds}{dt} = - \left(\frac{1}{Y_{xs}} \right) \mu \max \left(\frac{S}{K_S+S}, \left(\frac{O_{2,d}}{K_{O_{2,d}}+O_{2,d}} \right) \right) x \quad (13)$$

Generación de producto (P)

$$\frac{dp}{dt} = \alpha \mu \max \left(\frac{S}{K_S+S}, \left(\frac{O_{2,d}}{K_{O_{2,d}}+O_{2,d}} \right) \right) x + \beta x \quad (14)$$

Oxígeno disuelto en la fase líquida (O_{2,d}):

$$\frac{dC_L}{dt} = K_{La}(C_{Ls} - C_L) - \frac{1}{Y_{x/o}} \mu \max \left(\frac{S}{K_S+S}, \left(\frac{O_{2,d}}{K_{O_{2,d}}+O_{2,d}} \right) \right) x \quad (15)$$

$$\text{Oxígeno en la corriente de gas (CG):} \quad \frac{dCG}{dt} = K_{La}(C_{Ls} - C_L) \quad (16)$$

donde μ_{\max} es la velocidad específica de crecimiento máxima, K_s es la constante de saturación, K_{O_{2,d}} es la constante de saturación del oxígeno, Y_{xs} es el rendimiento biomasa-sustrato, α es el coeficiente de producción asociado al crecimiento y β es el coeficiente de producción independiente al crecimiento, K_{La} es el coeficiente global de transferencia de oxígeno, C_{Ls} concentración de oxígeno en equilibrio entre la fase gas y la fase líquida, CG es la concentración de oxígeno en la corriente de gas, Y_{x/o} es el rendimiento de la biomasa con respecto al oxígeno.

Tabla 1.

Ecuaciones empleadas para describir los elementos del cultivo por lotes de *A. flavipes* FP-500. Se establecen ecuaciones para cada una de las n etapas del riser (r), downcomer (d) y corona (c) del biorreactor Airlift de tubo concéntrico de 10 L.

Elemento	Modelo cinético que lo describe		Sección
Biomasa	$\frac{dX_{i,r}}{dt} = \frac{F}{(V_r(1-\varepsilon_r))} (X_{n,r-i} - X_{i,r}) + \frac{S_{i,r}}{K_S+S_{i,r}} \frac{CL_{i,r}}{K_C+CL_{i,r}} X_{i,r}$	(17)	R
	$\frac{dX_c}{dt} = \frac{F}{(V_c(1-\varepsilon_r))} (X_{n,r-i} - X_c) + \frac{S_c}{K_S+S_c} \frac{CL_c}{K_C+CL_c} X_c$	(18)	C
	$\frac{dX_{i,d}}{dt} = \frac{F}{(V_r(1-\varepsilon_d))} (X_{n,d-i} - X_{i,d}) + \frac{S_{i,d}}{K_S+S_{i,d}} \frac{CL_{i,d}}{K_C+CL_{i,d}} X_{i,d}$	(19)	D
Sustrato	$\frac{dS_{i,r}}{dt} = \frac{F}{(V_r(1-\varepsilon_r))} (S_{n,r-i} - S_{i,r}) - \frac{1}{Y_{XS}} \mu \frac{S_{i,r}}{K_S+S_{i,r}} \frac{CL_{i,r}}{K_C+CL_{i,r}} X_{i,r}$	(20)	R
	$\frac{dS_c}{dt} = \frac{F}{(V_c(1-\varepsilon_r))} (S_{n,r-i} - S_c) - \frac{1}{Y_{XS}} \mu \frac{S_c}{K_S+S_c} \frac{CL_c}{K_C+CL_c} X_c$	(21)	C
	$\frac{dS_{i,d}}{dt} = \frac{F}{(V_d(1-\varepsilon_d))} (S_{n,d-i} - S_{i,d}) - \frac{1}{Y_{XS}} \mu \frac{S_{i,d}}{K_S+S_{i,d}} \frac{CL_{i,d}}{K_C+CL_{i,d}} X_{i,d}$	(22)	D
Exopectinasas	$\frac{dExo_{i,r}}{dt} = \frac{F}{(V_r(1-\varepsilon_r))} (Exo_{n,i} - Exo_{i,r}) + \alpha Exo \mu \frac{S_{i,r}}{K_S+S_{i,r}} \frac{CL_{i,r}}{K_C+CL_{i,r}} X_{i,r} + \beta X_{i,r}$	(23)	R
	$\frac{dExo_c}{dt} = \frac{F}{(V_c(1-\varepsilon_r))} (Exo_{n,r-i} - Exo_c) + \alpha Exo \mu \frac{S_c}{K_S+S_c} \frac{CL_c}{K_C+CL_c} X_c + \beta X_c$	(24)	C
	$\frac{dExo_{i,d}}{dt} = \frac{F}{(V_d(1-\varepsilon_d))} (Exo_{n,d-i} - Exo_{i,d}) + \alpha Exo \mu \frac{S_{i,d}}{K_S+S_{i,d}} \frac{CL_{i,d}}{K_C+CL_{i,d}} X_{i,d} + \beta X_{i,d}$	(25)	D
Endopectinasas	$\frac{dEn_{i,r}}{dt} = \frac{F}{(V_r(1-\varepsilon_r))} (En_{n,r-i} - En_{i,r}) + \alpha En \mu \frac{S_{i,r}}{K_S+S_{i,r}} \frac{CL_{i,r}}{K_C+CL_{i,r}} X_{i,r} + \beta X_{i,r}$	(26)	R
	$\frac{dEn_c}{dt} = \frac{F}{(V_c(1-\varepsilon_r))} (En_{n,r-i} - En_c) + \alpha En \mu \frac{S_c}{K_S+S_c} \frac{CL_c}{K_C+CL_c} X_c + \beta X_c$	(27)	C
	$\frac{dEn_{i,d}}{dt} = \frac{F}{(V_d(1-\varepsilon_d))} (En_{n,d-i} - En_{i,d}) + \alpha En \mu \frac{S_{i,d}}{K_S+S_{i,d}} \frac{CL_{i,d}}{K_C+CL_{i,d}} X_{i,d} + \beta X_{i,d}$	(28)	D
Oxígeno disuelto (CL)	$\frac{dCL_{i,r}}{dt} = \frac{F}{(V_r(1-\varepsilon_r))} (CL_{n,r-i} - CL_{i,r}) + KLa(CL_s - CL_{i,r}) - q_{O_2} X_{i,r}$	(29)	R
	$\frac{dCL_c}{dt} = \frac{F}{(V_c(1-\varepsilon_r))} (CL_{n,r-i} - CL_c) + KLa(CL_s - CL_c) - q_{O_2} X_c$	(30)	C
	$\frac{dCL_{i,d}}{dt} = \frac{F}{(V_d(1-\varepsilon_d))} (CL_{n,d-i} - CL_{i,d}) - q_{O_2} X_{i,d}$	(31)	D*
Oxígeno en la fase gas (Cg)	$\frac{dCG_{i,r}}{dt} = \frac{G}{(VG_r \varepsilon_r)} (CG_{n,r-i} - CG_{i,d}) - KLa(CL_s - CL_{i,r}) \frac{1}{\varepsilon_r}$	(32)	R
	$\frac{dCG_c}{dt} = \frac{G}{(VG_c \varepsilon_r)} (CG_{n,r-i} - CG_c) - KLa(CL_s - CL_c) \frac{1}{\varepsilon_r}$	(33)	C

*Bajo el supuesto de que la velocidad de deslizamiento de burbujas de aire es despreciable en el downcomer, entonces la transferencia de masa en esta sección puede no ser considerada (Bello et al., 1985; Guieysse et al., 2011).

Planteamiento del modelo en el BALTC

Dado que el riser y el downcomer del reactor Airlift tienen diferentes características de flujo y mezclado (Guieysse et al., 2011), y el volumen de retención de gas en el líquido (ε) es diferente en cada una de estas secciones (ver ecuaciones 7 y 8), es necesario plantear balances de materia dinámicos para las diferentes etapas del riser y el downcomer. La corona exhibe un comportamiento de un tanque perfectamente mezclado, y puede ser tratada bajo las mismas consideraciones que la última etapa del riser (Znad et al., 2004). Las ecuaciones declaradas en la Tabla 1 componen el conjunto de ecuaciones del modelo matemático del BALTC, las cuales se programaron en Polymath 5.0 utilizando el método de Runge-Kutta 45 para su solución. Los valores de los parámetros cinéticos se reportan en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros cinéticos empleados para resolver el modelo cinético establecido para la descrip-

ción de las especies a lo largo del cultivo sumergido de *A. flavipes* FP-500 en el biorreactor Airlift de tubos concéntricos de 10 L

Parámetro	Valor	Referencia
μ_{max}	0.087 h ⁻¹	(Wolf et al., 2015)
KS	0.0703 g/L	(Martínez-Trujillo et al., 2012)
KCL	0.001g/L	(Znad et al., 2004)
Vr	3.504 L	(Arauz, 2014)
Vc	3.148 L	(Arauz, 2014)
Vd	3.981 L	(Arauz, 2014)
G	918 L/h	(Vera et al., 2017)
F	192 L/h	(Arauz, 2014)
α_{Endo}	1200 U/g _{biomasa}	(Wolf et al., 2015)
β_{Endo}	11 U/g _{biomasa}	(Wolf et al., 2015)
α_{Exo}	17.970 U/g _{biomasa}	(Wolf et al., 2015)
β_{Exo}	6 U/g _{biomasa}	(Wolf et al., 2015)
K_{La}	$K_{La}=4.78 [(F*Ar)]^{0.997}$	(Merchuk et al., 1980)
Y_{xo}	2.2 g/g	(Nuñez, 2014)
Y_{xs}	0.49 g/g	(Fontana, 2009)

Resultados y Discusión

Para la caracterización hidrodinámica del reactor y el cálculo del número de etapas para la sección del riser y el downcomer del BALTC, se utilizaron las siguientes dimensiones geométricas del BALTC construido en el presente trabajo: $A_r = 0.0033m^2$, $A_d = 0.047 m^2$, $D_r = 0.065 m$ y $D_c = 0.095 m$, así como los parámetros hidrodinámicos, que se reportan en la Tabla 3 (Arauz, 2014).

El grado de mezclado del BALTC se aproximó con las siguientes etapas: 5 en el riser, una etapa independiente en la corona y 4 en la sección del downcomer.

Tabla 3.

Parámetros hidrodinámicos del reactor usados para calcular el número de etapas a considerar.

U_{Gr}^* (m/s)	U_{Lr}^{**} (m/s)	ϵ_r	ϵ_d	ϵ_g	D_{ax} (m ² /s)	V_{Lr} (m/s)	V_{Ld} (m/s)	h_L (m)	h_D (m)
0.0775	0.3970	0.1522	0.1355	0.0799	0.0119	0.4683	0.3247	0.9935	1.313

$$*U_{Gr} = \frac{QmRT}{h_L A_r \rho_L g} \ln \left(1 + \frac{\rho_L g h_L}{P_h} \right) \text{ (Guieysse et al., 2011)}. \quad ** U_{Lr} = 0.23 U_{Gr}^{0.32} \frac{A_d^{0.97}}{A_r} \eta_{eff}^{-0.39} \text{ (Popović y Robinson, 1988)}.$$

Las predicciones del modelo del cultivo de *A. flavipes* FP-500 para la producción de endo y exopectinas, así como la evolución del crecimiento fúngico, el consumo de sustrato, la transferencia de masa del oxígeno y su consumo se muestran en la Figura 2. En esta sólo se presentan las concentraciones de las especies en función del tiempo en la última etapa del downcomer, puesto que un tiempo de un ciclo de recorrido de toda la columna (riser + corona + downcomer), conocido como tiempo espacial ($t_{esp} = H/[VI]_{(t,d)}$), no se observaron cambios significativos de estas especies.

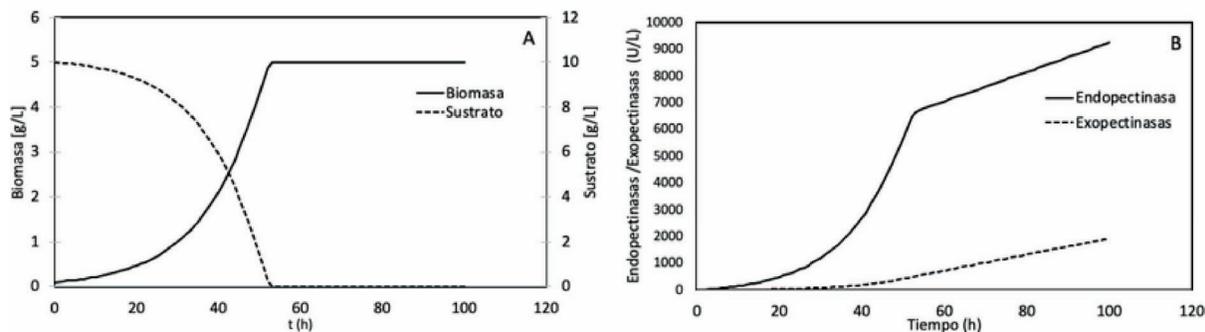


Figura 2. Evolución de (A) biomasa y sustrato y (B) la producción de exo y endopectinasas por *A. flavipes* FP-500 en un biorreactor ALTC de 10 L de capacidad en modo intermitente con recirculación, flujo volumétrico de gas de 918 L/h.

Los resultados de la predicción del modelo concuerdan con los datos experimentales reportados para la producción de pectinasas por *A. flavipes* FP-500 (Wolf et al., 2015). Por otro lado, en los análisis del MNTS suele destacarse la evolución del oxígeno disuelto y el de la fase gas, pero no se muestra la evolución de la biomasa, el sustrato o el producto.

En la Figura 3 se presentan los cambios de concentración del oxígeno disuelto (Figura 3A) y la concentración de oxígeno en la corriente de gas (Figura 3B) para cada una de las etapas del reactor. Los resultados muestran que en las etapas que corresponden al riser, la transferencia de masa es mayor que el consumo de oxígeno. Sin embargo, en el downcomer, el perfil de oxígeno disminuye significativamente. Lo anterior es consistente, puesto que en la sección del downcomer no hay suministro de gas, y el consumo de oxígeno por los microorganismos es mayor que la tasa de transferencia de masa.

La tendencia de los datos de oxígeno disuelto y oxígeno en la fase gas es similar a la que suele describirse con el MDA en los BALTC (Znad et al., 2006), aunque el MNTS muestra que el máximo consumo de oxígeno disuelto y la máxima transferencia de oxígeno del gas al líquido, se obtiene en los tiempos correspondientes a la fase exponencial del crecimiento fúngico, y termina cuando se agota el sustrato (aprox. 50h).

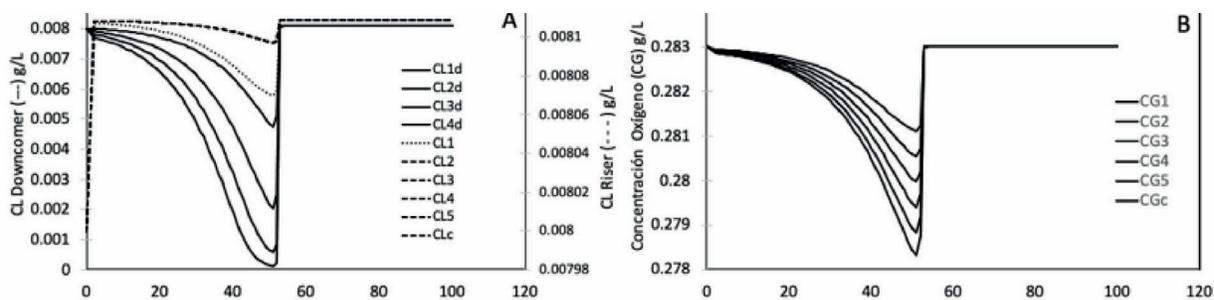


Figura 3. Simulación consumo de oxígeno fase líquida (A) y el consumo de oxígeno fase gas (B)

Los resultados de la simulación basados en el modelo matemático propuesto, utilizando los parámetros cinéticos citados previamente en la Tabla 1, indican que el modelo provee una adecuada descripción de la evolución del cultivo.

Conclusiones

El modelo propuesto describe adecuadamente los cambios transientes de las especies involucradas en el cultivo y permite comprender mejor la transferencia de oxígeno en reactores de tipo Airlift. Además, puede ser utilizado en estudios de diseño similares.

Agradecimientos

Se agradece al Tecnológico Nacional de México por el proyecto 10074.21-PD, y al CONACYT, por la beca de estudios de Maestría (CVU 1034633).

Referencias

- Arauz T. Yennifer. (2014). Síntesis de MnO₂ mediante ozonización en una columna Airlift, utilizando una solución modelo del lixiviado de las pilas alcalinas de desecho. Tesis Maestría en Ciencias en Ingeniería Química. TESE.
- Bello, R. A., Robinson, C. W., & Moo-Young, M. (1985). Gas holdup and overall volumetric oxygen transfer coefficient in Airlift contactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(3), 369-381.
- Behin, J. (2010). Modelado de reactor de bucle de transporte aéreo modificado con tubo concéntrico de doble tiro. *Investigación y diseño de ingeniería química*, 88 (8), 919-927.
- Doran, PM (1995). Principios de la ingeniería de bioprocesos. Elsevier.
- Fontana, R. C., Polidoro, T. A., & da Silveira, M. M. (2009). Comparison of stirred tank and Airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology*, 100(19), 4493-4498.
- Gómez Sánchez, C. E., Martínez-Trujillo, A. & Aguilar Osorio, G., (2012). Oxygen transfer coefficient and the kinetic parameters of exo-polygalacturonase production by *Aspergillus flavipes* FP-500 in shake flasks and bioreactor. *Letters in Applied Microbiology*, 55(6), 444-452.
- Guicysse, B., Quijano, G., & Muñoz, R. (2011). 2.16 Airlift Bioreactors. In *Comprehensive Biotechnology* (pp. 199-212). Academic Press Burlington.
- Martínez-Trujillo, M.A., Aranda, J.S. & Aguilar Osorio, G. (2012). Polygalacturonases of *Aspergillus flavipes* FP-500: a kinetic analysis of batch culture systems based on unstructured models. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 10(1).
- Merchuk, JC, Stein, Y. y Mateles, RI (1980). Modelo de parámetros distribuidos de un fermentador de transporte aéreo. *Biotecnología y Bioingeniería*, 22(6), 1189-1211.
- Nandi, S. (2010). Biodesulfuración deiesel hidrodesulfurado en reactor de transporte aéreo. *Journal of Scientific & Industrial Research*.
- Neviani, M., Bagnerini, P., & Paladino, O. (2021). Gas bubble dynamics in airlift photo-bioreactors for microalgae cultivation by level set methods. *Fuel*, 292, 120402.

- Nuñez, S. (2014). Estimación y control de procesos biotecnológicos multivariables (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Pawar, S. B. (2018). Computational fluid dynamics (CFD) analysis of Airlift bioreactor: effect of draft tube configurations on hydrodynamics, cell suspension, and shear rate. *Bioprocess and biosystems engineering*, 41(1), 31-45.
- Popović, M., & Robinson, C. W. (1988). External circulation loop Airlift bioreactors: study of the liquid circulating velocity in highly viscous non Newtonian liquids. *Biotechnology and bioengineering*, 32(3), 301-312.
- Sikula, I., Jurašćik, M., & Markoš, J. (2007). Modeling of fermentation in an internal loop airlift bioreactor. *Chemical Engineering Science*, 62(18-20), 5216-5221.
- Vera G. et al. 2017. "Comparación de la producción de pectinasas por *Aspergillus flavipes* FP-500 en un biorreactor Airlift y tanque agitado, empleando como sustrato cáscara de limón" Memorias del XXXVIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ.
- Wolf-Márquez, V. E., García-García, E., García-Rivero, M., Aguilar-Osorio, G., & Trujillo, M. M. (2015). Batch and pulsed fed-batch cultures of *Aspergillus flavipes* FP-500 growing on lemon peel at stirred tank reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177(6), 1201-1215.
- Znad, H., Bálež, V., & Kawase, Y. (2004). Modeling and scale up of Airlift bioreactor. *Computers & chemical engineering*, 28(12), 2765-2777.
- Znad, H., Tokumura, M., & Kawase, Y. (2006). Axial distribution of oxygen concentration in different airlift bioreactor scales: Mathematical modeling and simulation. *Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry* □ *Plant Equipment Process Engineering*

“Biotecnología y ciencias alimentarias
como herramientas de solución a
Problemáticas actuales”

Se terminó de editar en Ciudad Obregón, Sonora, el 30 de diciembre de 2021
por la Oficina de Publicaciones del Instituto Tecnológico de Sonora.

Fue puesto en línea para su disposición en el sitio
www.itson.mx
en la sección de Publicaciones.

Biotecnología y Ciencias Alimentarias como Herramientas de Solución a Problemáticas Actuales es un e-book que presenta la compilación de los mejores trabajos en extenso específicamente en las siguientes áreas temáticas: ciencia y tecnología de los alimentos, nutrición, biotecnología industrial, bioingeniería y reproducción vegetal. Todos los trabajos fueron presentados en el Congreso Internacional de Biotecnología y Ciencias Alimentarias realizado en el Instituto Tecnológico de Sonora por el Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, a través de sus Programas Educativos de Ingeniero Biotecnólogo y de Licenciado en Tecnología de Alimentos, en conjunto con los Cuerpos Académicos de Ambiente y Salud, Bioprocesos y Bioproductos, Biotecnología y Ciencias Alimentarias y Biotecnología y Productos Naturales; se llevó a cabo, por primera vez y en su totalidad en modalidad virtual, apoyándonos en la tecnología de comunicación de internet por diversas plataformas de transmisión en línea, siendo un gran reto, y todo un éxito, gracias a la participación de la comunidad científica nacional e internacional a través de académicos y estudiantes de diversas universidades e institutos de investigación.