

Editorial



Por concepto, las innovaciones tecnológicas tienen como propósito, entre otras funciones, auxiliar al ser humano en su vida cotidiana, laboral o escolar y brindarle comodidades, como por ejemplo ayudarlo a trasladarse más rápido, evitarle realizar labores tediosas, repetitivas, complejas, peligrosas, o que consuman mucho tiempo.

Sin embargo, una mala interpretación de estas aplicaciones de la ciencia, en muchos casos ha llevado a la creación de implementos de utilidad discutible o que explotan sistemas obsoletos, como por ejemplo las videocámaras que grababan directamente en un CD, las cuales aún se comercializaban en el 2007, cuando ya existían elementos que bien podían reemplazar al disco, como las memorias SD, las Unidades de Almacenamiento USB y los discos duros para Lap Top.

El objetivo no debe ser la creación de aditamentos que hagan inútiles a las personas, sino que les permitan dedicar su tiempo a cosas trascendentes. De igual forma, es necesario enfocar la creatividad al desarrollo y reingeniería en áreas que no han tenido grandes progresos desde su creación y que en cambio sí reportan un beneficio tangible, por ejemplo las baterías eléctricas de los autos y camiones, o el mobiliario urbano, en donde resulta imperioso crear semáforos que detecten el flujo de automóviles y con base en ello otorguen el siga o el alto; crear mapas y módulos informativos a partir de sistemas computarizados y localizadores satelitales, etcétera.

Por ello, es de fundamental importancia dar a conocer cuáles son los trabajos y las líneas de investigación sobre las que se está trabajando en cada centro, y esa es la razón de existir de revistas como *Tecnocultura*, el escaparate a través del cual, los maestros e investigadores del TESE y colaboradores externos, pueden mostrar al mundo el resultado de sus conocimientos aplicados.

Así, en este número se presentan tres artículos inmersos en el ámbito alimentario; el primero de ellos se refiere a los métodos alternativos de conservación de alimentos para aumentar la vida útil de productos marinos, a partir de reducir la actividad enzimática de su carne, empleando para ello inhibidores naturales obtenidos a partir de nada menos que las leguminosas, como el garbanzo, soya y alubia.

El segundo, aborda el tema de las emulsiones multicapa para la sustitución de grasa animal en productos cárnicos procesados, aplicando emulsificantes y biopolímeros para crear una barrera físico-química, que les permitan resistir las condiciones del ambiente y su manejo, pero sin alterar en lo posible, su consistencia y sabor.

Y el tercero, pero no menos interesante, se refiere a los usos industriales del chile (*capsicum sp.*), que van desde sus aplicaciones en medicamentos, colorantes, saborizantes y hasta en dispositivos para la protección personal, como arma no letal.

En otro orden de ideas, y respecto las funciones estructurales, operativas y de organización de las empresas, se incluye el tema de los Sistemas de Información como recursos estratégicos del negocio, dado que todas necesitan que cierta información fluya a tiempo, tanto al interior como al exterior, a fin de coordinar sus acciones operativas y tomar decisiones de manera coherente con los objetivos de la misma.

Por último, se incluyen dos artículos enmarcados en el ámbito de la biotecnología: uno relativo a la aplicación de los nemátodos (entomopatógenos que causan enfermedades a determinados insectos perjudiciales) como biorreguladores en el control de plagas agrícolas, y otro, donde se muestran los resultados de una investigación sobre los efectos de los solventes en la biodegradación de Diesel, en un sistema de suelo en suspensión, trabajo en el cual se encontró que la aplicación de ciertos solventes y calor, juegan un papel fundamental en el resultado obtenido.

Como podemos observar, son temas cuyo seguimiento y evolución potencial son factibles para todos, pero fundamentalmente para grupos interdisciplinarios de investigadores.

GOBIERNO DEL ESTADO DE MÉXICO

LIC. ENRIQUE PEÑA NIETO
Gobernador Constitucional del Estado de México

LIC. MARÍA GUADALUPE MONTER FLORES
Secretaria de Educación

LIC. JORGE CRUZ MARTÍNEZ
Subsecretario de Educación Media Superior y Superior

AUTORIDADES DEL TESE

M. EN A. URIEL GALICIA HERNÁNDEZ
Director General

M. EN A. ALFONSO MARTÍNEZ REYES
Director Académico

M. EN A. ÁLVARO GÓMEZ CARMONA
Director de Administración y Finanzas



ING. ALFONSO CASTAÑEDA SILES
Director de Apoyo y Desarrollo Académico

LIC. JORGE ROJAS SÁNCHEZ
Director de Vinculación y Extensión

LIC. JOSÉ MISAEL MARÍN LUCIANO
Abogado General

M. EN A. RICARDO FÉLIX ONIEL JIMÉNEZ HERNÁNDEZ
Contralor Interno

CONSEJO EDITORIAL

DR. ADOLFO GUZMÁN ARENAS
DR. JUAN JOSÉ SALDAÑA
DR. FELICIANO SÁNCHEZ SINENCIO
DR. CARLOS ORNELAS

TECNOCULTURA

REVISTA TECNOCULTURA

Director
M. en A. Uriel Galicia Hernández

Editor
Lic. María Isabel Arroyo Pérez

Corrección de estilo
Lic. Rafael Ortiz Hernández

Diseño y formación
D.G. José Francisco Díaz Pantaleón

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN
SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN MEDIA SUPERIOR Y SUPERIOR
TECNOLÓGICO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE ECATEPEC



En portada

Tecnocultura, revista de divulgación del conocimiento científico, tecnológico y humanístico del Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. Año 6, No. 17, septiembre-diciembre de 2007. Número de autorización del Comité Editorial de la Administración Pública Estatal CE:205/5160/07. Edita y distribuye la Unidad de Relaciones Públicas y Difusión, domicilio: Av. Tecnológico (antes Valle del mayo) s/n, Col. Valle de Anáhuac, C.P. 55210, Ecatepec, Estado de México. Teléfono 50 00 23 14. Correo electrónico: difusion@tese.edu.mx. Impreso en noviembre de 2007. Imprenta: Impresores Nasaka, S.A. de C.V., domicilio: Paseo Tollocan No. 802, Col. Residencial Colón, Toluca, Estado de México. C.P. 50120. Tel.: 017222142014

Número de Reserva de Derechos al Uso Exclusivo del Título ante el Instituto Nacional del Derecho de Autor de la Secretaría de Educación Pública: 04-2006-090109555900-102, ISSN: 1870-7157. Certificados de Título y de Contenido en trámite. Se imprimen 1000 ejemplares. Se autoriza la reproducción total o parcial del material publicado en Tecnocultura, siempre y cuando cite la fuente. Los artículos son responsabilidad de los autores.

<http://tecnocultura.tese.edu.mx>

Contenido

10

Panorama Actual de la Investigación en México y el Mundo

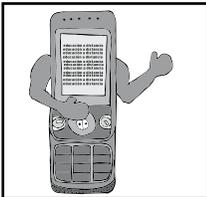
M. en C. Rafael Pérez Bedolla



19

Tecnologías para la Implementación del M-learning (Aprendizaje Móvil)

Ing. Irene Aguilar Juárez
M. en C. Mercedes Flores Flores



32

Caracterización del Gen LI de la Proteína Mayoritaria de la Cápside del Virus del Papiloma Humano para su Clonación en Hairy Roots de Brassica oleracea var italica (Brócoli)

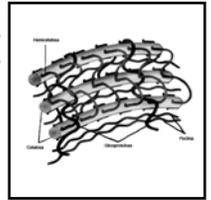
Juan Manuel Jiménez Antaño
María del Carmen Montes Horcasitas
Emma Gloria Ramos Ramírez Armando Ariza Castolo
Josefina Pérez Vargas
Gómez-Guzmán Octavio
Graciano Calva Calva



Xilanasas Microbianas y su Aplicación Industrial

Laura Mireya Flores Niño
Ma. Aurora Martínez Trujillo

4



14

Producción de Biosurfactantes en Función de la Remoción de Queroseno por Bacterias Fijadoras de Nitrógeno

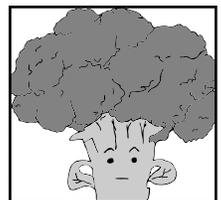
Josefina Pérez Vargas
Graciano Calva Calva



26

Inducción de Raíces Transformadas de Brassica oleracea var. italica (brócoli) Útiles para la Producción de Proteínas Heterólogas con Actividad Terapéutica)

Edgar García López *
Emma G Ramos Ramírez *
Armando Ariza Castolo **
Josefina Pérez Vargas ***
Octavio Gómez Guzmán *
Graciano Calva Calva *



Xilanasas Microbianas y su Aplicación Industrial

Laura Mireya Flores Niño*
Ma. Aurora Martínez Trujillo**

Palabras clave: xilano, xilanasas, aplicaciones industriales.

Resumen

Las xilanasas son un conjunto de enzimas, producidas por algunos microorganismos, que actúan de manera sinérgica y secuencial sobre la estructura del xilano para degradarlo y convertirlo a sus azúcares constitutivos. Su importancia a nivel industrial radica en esa capacidad de degradar dicho polisacárido. En las últimas décadas, las xilanasas han encontrado aplicaciones en diversos procesos industriales. Este trabajo presenta una breve revisión de las características del xilano como estructura, las xilanasas como sistema enzimático y las aplicaciones industriales de estas últimas.

Abstract

Xylanases are a group of enzymes produced by some microorganisms. They act in synergic and sequential way on xylan structure, degrading it into the constitutive sugars. Its importance on industrial level is because their ability for degrading this polysaccharide. In the last decades, xylanases have been applied in several industrial processes. This work presents a mini review about the characteristics of xylan as structure, xylanases as enzymatic system and the main industrial application of these enzymes.

Acerca de los autores...

* Estudiante de la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica del TESE,

** Profesora de la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica del TESE

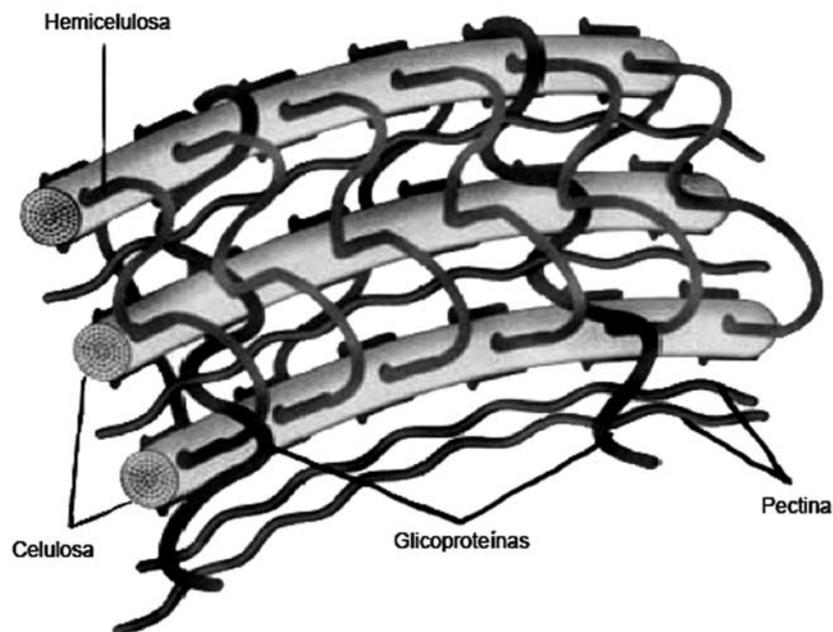


Figura. 1. Representación de la pared celular de las plantas y de la disposición de los polisacáridos que la conforman (celulosa, pectina y hemicelulosa).

Los polisacáridos de la pared celular

La pared celular de las plantas está formada en un 90% por polisacáridos, lo que hace a éstos los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza. Los polisacáridos pueden dividirse en tres grandes grupos, tal como se muestra en la Figura 1.

1) La celulosa. Es el mayor componente de los polisacáridos de la pared celular y es un polímero lineal conformado por residuos de D-glucosa (unidos por enlaces β -1,4), dispuesto en forma de fibras. Una de sus principales funciones es la de conferir rigidez a la pared celular (de Vries y Visser, 2001)

2) La pectina. Es un heteropolisacárido complejo, conformado por una cadena lineal de unidades de ácido D-galacturónico, unidos entre sí por enlaces α -1,4, que pueden estar acetilados en los carbonos 2 ó 3, y metilados en el carbono 6, además de tener ramificaciones de azúcares como arabinosa, galactosa, xilosa y fucosa, entre otros. Su función en la pared celular de las plantas es como cemento intercelular (Have et al., 2002).

3) La hemicelulosa. Es un grupo de polisacáridos heterogéneos que conforma al segundo compuesto orgánico más abundante en la pared celular de las plantas. De todos los polisacáridos que integran al grupo de las hemicelulosas, el xilano es el más representativo, debido a su abundancia en los cereales y en la madera (De Vries y Visser, 2001). Su presencia en la pared celular de las plantas, le confiere la porosidad adecuada

Estructura del xilano

El xilano está compuesto por una cadena lineal de unidades de D-xilosa, unidas por enlaces β -1,4, con ramificaciones de otros azúcares, como ácidos glucurónicos, arabinosas, galactosas, ácidos ferúlicos y xilosas, tal como se muestra en la Figura 2.

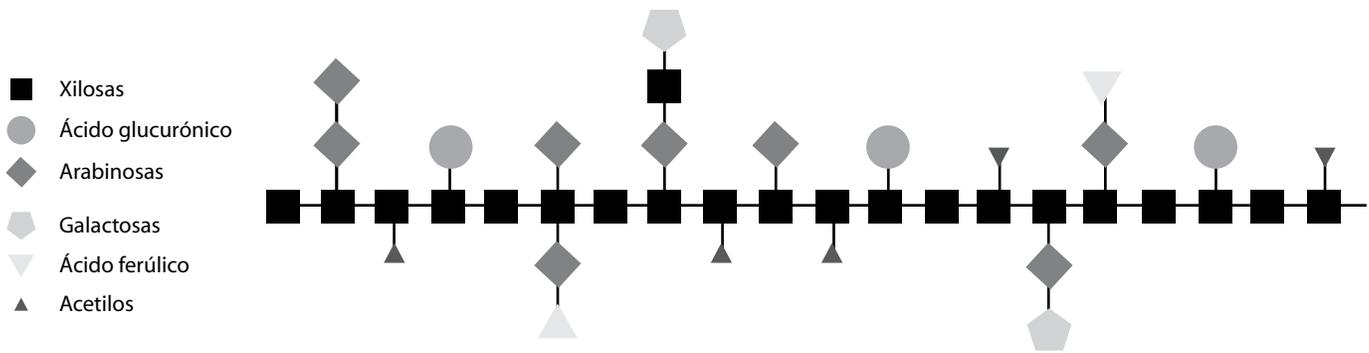


Figura 2. Representación de la estructura del xilano (De Vries y Visser, 2001).

Las ramificaciones de la cadena principal del xilano dependen de la fuente de donde provenga. Así, en la madera de abedul el 89.3% es xilosa, el 1% arabinosa, el 1.4% es glucosa y el 8.3% es ácido anhidrouónico; en el trigo el 65.8% es xilosa, el 33.5% es arabinosa, 0.1% es manosa, el 0.1% es galactosa, y el 0.3% es glucosa; el arroz contiene 46% de xilosa, 44.9% de arabinosa, 6.1% de galactosa, 1.9% de glucosa y 1.1% ácido anhidrouónico (Saha, 2003). En general, el xilano es la mayor hemicelulosa en la madera de las angiospermas (del 15 al 30%), pero es la menos abundante en la madera de las gimnospermas (del 7 al 12%) (Wong *et al*, 1988).

Las xilanasas

El xilano, así como los materiales que lo contienen, pueden ser utilizados como única fuente de carbono por los microorganismos que poseen la capacidad de producir el sistema enzimático encargado de degradarlos. Entre dichos microorganismos es posible encontrar diversas levaduras, bacterias y hongos.

El sistema enzimático encargado de degradar al xilano y los materiales ricos en éste, se conoce como sistema xilanolítico. Está conformado por un

conjunto de enzimas hidrolíticas que actúan de manera sinérgica y secuencial para degradar al xilano hasta sus azúcares constitutivos. En general, el sistema xilanolítico se encuentra formado por cinco tipos diferentes de xilanasas, las cuales actúan de manera específica sobre la estructura del xilano (Ponce-Noyola y Pérez Ávalos, 2002; Saha, 2003):

1) Endo-β-D-xilanasas. Estas enzimas actúan de manera aleatoria sobre la estructura del xilano, atacando los enlaces glicosídicos de la cadena principal de la molécula, liberando xilooligosacáridos de menor tamaño.

2) Exo-β-D-xilosidasas. Catalizan la hidrólisis de 1,4-β-D-xilooligosacáridos, cortando a partir de los residuos de D-xilosa no reducidos.

3) α-arabinofuranosidasas. Hidrolizan las cadenas laterales de arabinosa.

4) Acetil-xilan-esterasas. Liberan los grupos acetato de la cadena principal.

5) Glucoronidasas. Remueven las cadenas laterales de ácido glucurónico a partir de unidades de xilosa.

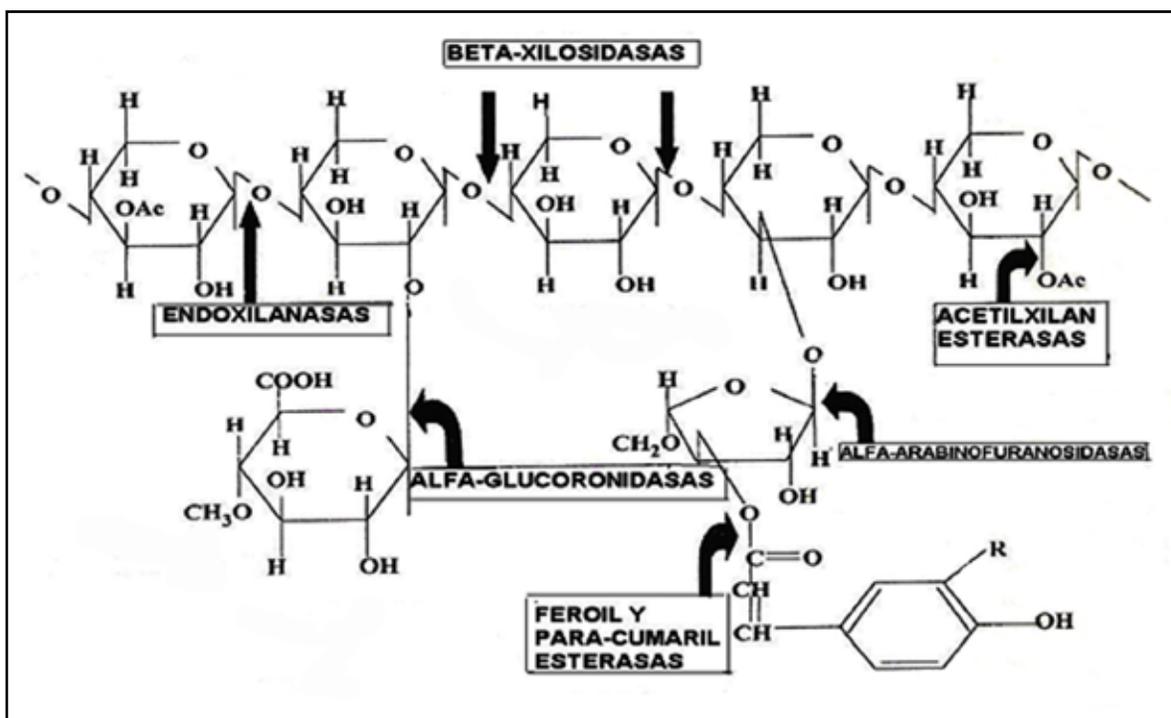


Figura. 3. Mecanismo de acción de las xilanasas sobre la estructura del xilano (Beg et al., 2001).

Importancia de las Xilanasas

El interés por las enzimas que forman al sistema xilanólítico comenzó alrededor de los años 50, debido a su enorme potencial para convertir la lignocelulosa en glucosa y azúcares solubles (Ponce-Noyola y Pérez-Ávalos, 2002). En la actualidad, el empleo de residuos agro-industriales ha ido en aumento en la producción de xilanasas por diversos microorganismos. La Tabla I resume los sustratos y microorganismos utilizados para este fin.

Sustrato	Microorganismo	Referencia
Xilano	<i>Aspergillus awamori</i>	Siedenberg et al., 1998
Xilano	<i>Streptomyces sp.</i>	Beg et al. 2001
Bagazo de caña	<i>Cellulomonas flavigena</i>	Pérez-Avalos et al., 1996
Bagazo de caña	<i>Streptomyces sp.</i>	Beg et al., 2001
Bagazo de caña	Cultivo mixto de hongos	Gutiérrez-Correa y Tengerdy, 1998
Olote de maíz	<i>Aspergillus awamori</i>	Siedenberg et al., 1998
Paja de arroz	<i>Bacillus circulans</i>	Subramaniyan y Prema, 2002
Avena	<i>Streptomyces sp.</i>	Subramaniyan y Prema, 2002

Tabla I. Producción de xilanasas en diversos sustratos.

La biotecnología de las xilanasas inició a principios de los años 80, primero en la alimentación animal (como aditivos en los alimentos para aves de corral), seguida por aplicaciones en la industria de alimentos, tales como la mejora en las propiedades nutricionales de los productos agrícolas y granos de forraje, la extracción del café, aceites de plantas y almidón, la clarificación de jugos y vinos, y para mejorar el manejo de la harina de trigo. Posteriormente empezaron a utilizarse en las industrias de lavandería, y la textil (para despegar las fibras de las plantas, tales como lino, cáñamo y yute), así como en el proceso de blanqueo de la pulpa y el papel (Beg et al., 2001).

Xilanasas en la industria de la panificación

En la industria de la panificación, las xilanasas, especialmente las endo-1,4- β -xilanasas, se adicionan a la masa para mejorar su calidad, logrando la obtención de panes con mejor textura y sabor (Ponce-Noyola y Pérez-Ávalos, 2002). La acción mejoradora de las xilanasas radica en la destrucción de la capacidad de enlace del agua con los xilanos de la harina de trigo, liberando agua y provocando una mayor suavidad de la masa. Lo anterior se ve reflejado en un aumento en el volumen de la masa horneada (Tucker y Woods, 1995).

Por su parte, en harinas con alto contenido de fibra, la adición de xilanasas mejora la costra, la textura de la hogaza y el volumen del pan. La absorción de agua en la masa disminuye en cierto modo, pero el contenido de humedad en el pan no se altera (Stauffer, 1991). Otro posible efecto de las xilanasas es el de compensar los efectos negativos de los xilanos insolubles presentes en la harina, que afectan el volumen de la hogaza y la estructura de la miga (Tucker y Woods, 1995).

Para los procesos de panificación, se aprovechan diversos preparados enzimáticos. Así, además de xilanasas, se utilizan amilasas, oxidasas y proteasas. Éstos se pueden emplear en un concentrado enzimático que contiene todas esas actividades o bien por separado, empleando preparaciones concentradas de las enzimas o una enzima pura. Empresas tales como la alemana Muhlenchemie cuentan con una extensa investigación respecto al uso de estas enzimas como mejoradoras de harinas, y ofrecen a las industrias un concentrado enzimático rico en xilanasas, llamado ALPHAMALT, que ha encontrado diversas aplicaciones en la industria panadera (www.muehlenchemie.de/español).

Por otro lado, la firma italiana Millbo comercializa xilanasas para la industria panadera. Su producto, de nombre M200 y M200X, se obtiene mediante una fermentación con *Aspergillus* spp en fermentación (www.millbo.it). En México, empresas como Danisco, Enmex y Paniplus son las encargadas de producir y comercializar preparaciones enzimáticas para industrias alimentarias.

Xilanasas en el blanqueo de la pulpa kraft

Una de las aplicaciones más destacadas de las xilanasas es la que se da en la industria de la pulpa y del papel, donde a través de estas enzimas se ha logrado la sustitución de blanqueadores químicos, como el cloro, en el proceso de blanqueo de la pulpa tradicional, luego de la remoción del 95% de la lignina (Durán, 1994). La enzima empleada en la delignificación de la pulpa kraft es la endo- β -xilanasas, aunque el enriquecer el concentrado xilanólico con otras enzimas hemicelulolíticas ha demostrado mayor eficacia en este tratamiento (Bajpai, 1999).

El mecanismo por el cual se blanquea la pulpa mediante la adición de enzimas, se basa en la acción de las xilanasas, que remueven y reprecipitan el xilano presente en la superficie de las fibras de la pulpa. Posteriormente se realiza la extracción de esta estructura, removiendo la lignina residual que le confiere el color café. Las xilanasas actúan en la superficie de las fibras de celulosa, haciendo una pulpa más permeable para la subsecuente extracción química de la lignina residual (Viikari et al., 1994).

Hoy día, un número significativo de fábricas de todo el mundo utilizan un proceso completo de blanqueo con xilanasas. Además, diferentes productos, incluyendo papeles para revistas y papeles con determinado tejido que son manufacturados con pulpas tratadas enzimáticamente, han sido introducidos con éxito al mercado (Ponce Noyola y Pérez-Ávalos, 2002).

Otras aplicaciones de las xilanasas

Las hemicelulosas interfieren con la biodisponibilidad de nutrimentos, afectando la productividad de los cereales empleados en la alimentación avícola. A ese respecto, las xilanasas se han aplicado para reducir la fibra no amilácea de harinas de alto valor proteico usadas en alimentos balanceados para pollo, lo que favorece la digestibilidad de la dieta (Lagunas Bernabé et al., 2006).

Lo que hacemos en el Laboratorio de Catálisis Enzimática del TESE

Una de las líneas de investigación que se siguen en el Laboratorio de Catálisis Enzimática del TESE está centrada en el uso de residuos agroindustriales para la producción de polisacarosas de interés industrial, a partir de la fermentación de estos materiales con hongos filamentosos. Específicamente, se trabaja

con cepas del género *Aspergillus*, clasificadas como buenas productoras de xilanasas, gracias a una colaboración con el Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos de la Facultad de Química de la UNAM.

A partir del 2006, comenzó a desarrollarse un proyecto, cuya espina dorsal es una tesis de maestría, la cual propone probar diversos residuos agroindustriales lignocelulósicos como sustratos, así como algunas condiciones de operación para obtener un concentrado enzimático rico en xilanasas; el objetivo principal es identificar las propiedades de las xilanasas que componen este concentrado, para que, a partir de ellas, sea posible proponer su uso a escala industrial.

Además del sistema xilanolítico, se tienen proyectos referentes al estudio de la producción de celulasas y pectinasas, que van desde la investigación básica (estudio del metabolismo del hongo) hasta la que implica una mayor tendencia a su aplicación industrial, como la optimización de las condiciones de cultivo para conseguir un tipo de enzima en particular (Martínez-Trujillo y Aguilar Osorio, 2007).

Bibliografía...

Bajpai, P. 1999. "Application of enzymes in the pulp and paper industry". *Biotechnol. Prog.* **15**:147-157.

Beg Q. K., M. Kapoor, L. Mahajan, G.S. y Hoondal (2001). "Microbial xylanases and their industrial applications: a review". *Applied Microbiology Biotechnology* **56**:326-338.

de Vries R. P. y Visser J. (2001). "Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**:497-522.

Durán, N. (1994). *Aspergillus* sp 2M1 xylanase: production, characterization and application in the pulp and paper industry. *Advances in Bioprocess Engineering*, 489-494.

Gutiérrez-Correa y Tengerdy, R. P. (1998). "Xylanase production by fungal fermentation on sugar cane bagasse". *Biotechnology Letters* **20** (1):45-47.

Have, A.T., Tenberge, K.B., Benen, J., Tudzynski, P., Visser, J. y Van Kan, A.L. (2002). "The contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of fungal plant pathogenus". *The Mycota XI, Agricultural Applications*. Capítulo 17 pp. 341 – 358. Kempken (Ed). Springer-Verlag Berlín Heidelberg.

Lagunas Bernabé, I., García Almedáñez, B., Castaño Tostado, E, Regalado-González, C. y Ávila González, E. (2006). *Producción de enzimas hemicelulolíticas por fermentación sólida y su aplicación en alimento balanceado para pollo de engorda*. *Vet. Méx.*, 37(1): 1-13.

Martínez-Trujillo, A. y Aguilar-Osorio, G. (2007). "La metodología de superficie de respuesta para describir la producción de endopoligalacturonasas por *Aspergillus flavipes* FP-500 sobre cáscara de limón". *Tecnocultura* **15**: 26-32

Pérez-Ávalos, O., Ponce-Noyola, T., Magaña-Plaza, I. y de la Torre M (1996). "Induction of xylanase and β -xylosidase in *Cellulomonas flavigena* growing on different carbon sources". *Applied Microbiology Biotechnology* **46**:405-409

Ponce Noyola T. y Pérez Avalos O. (2002). "Celulasas y Xilanasas en la industria". *Avance y Perspectiva* **21**:273-277.

Saha, B.C. (2003). "Hemicellulose bioconversion". *J Ind Microbiol Biotechnol* **30**:279-291.

Siedenberg, D., Gerlach, SR., Schugeri K., Giuseppin M.F. Hunik J. (1998). "Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in shake flask cultures". *Process Biochemistry* **33**:429-433.

Stauffer, C.E. (1991). "Functional additives for bakery foods". *Van postran reinhold*, 136-151.

Subramanian S. y Prema P. (2002). "Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application. Critical". *Reviews in Biotechnology* **22**:33-46.

Tucker, G.A. y Woods, L.F.J. (1995). "Enzymes in food processing". *Chapman and Hall*, 2nd edition, 190-221.

Viikari L., Kantelinen A., Sundquist J. y Linko M. (1994) "Xylanases in bleaching: From an idea to the industry". *FEMS Microbiology Reviews* **13**:335-350.

Wong KKY, Tan LUL., y Saddler J. N. (1988). "Multiplicity of β -1,4-Xylanase in microorganisms: functions and applications".

Panorama Actual de la Investigación en México y el Mundo

M. en C. Rafael Pérez Bedolla*

Introducción

La ciencia es un estilo de pensamiento y acción, el más provechoso de todos, pero en la ciencia debemos distinguir entre el trabajo-investigación y su producto final, el conocimiento.

Una investigación científica arranca con la percepción de que el acervo de conocimiento disponible es insuficiente para manejar determinados problemas. Una porción del conocimiento previo a partir del cual inicia toda investigación, es de carácter ordinario, no especializado, y la sección restante es conocimiento científico. La tendencia global es vincular las áreas del conocimiento con la investigación, de no ser así el futuro sería poco prometedor para las nuevas generaciones.

Sin embargo, no todo está perdido, en nuestro país existen instituciones encargadas de dar seguimiento a las investigaciones que se llevan a cabo, donde tal vez lo único que falta es el fortalecimiento y la difusión de ellas, dejando a

un lado los intereses de sectores particulares para comenzar a emprender un nuevo horizonte que sea benéfico para la nación. Por tal motivo, en este primer ensayo se analizará el panorama actual de la investigación en México y el mundo, con base en lecturas y artículos difundidos por instituciones educativas y de investigación, para dar a conocer sus puntos de vista sobre esta perspectiva.



Desarrollo

En México, la Investigación y el Desarrollo Experimental (IDE) se caracterizan tanto por una baja inversión nacional con una alta proporción de financiamiento público (cerca del 75%), además de una participación sumamente reducida del gasto del sector productivo (alrededor de 25%), en comparación con los países industrializados.

Nuestro país necesita resolver sus grandes rezagos y retos en materia científica y tecnológica. De acuerdo el INEGI, en el 2000 se destinó a IDE el 0.4% del PIB, cuando la Organización de las Naciones Unidas recomendaba que al final de la década de los años setenta, los países en desarrollo deberían incrementar su gasto en esa materia y en servicios científicos y tecnológicos, al 1% del Producto Interno Bruto. Lo anterior coloca a México entre los últimos lugares de los miembros de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico.

Ramón Mariaca Méndez, en su artículo titulado “El futuro de la investigación científica en México”, menciona que es fácil iniciar el tema afirmando que si nuestros políticos y administradores nacionales fuesen capaces de cuantificar la inmensa cantidad de divisas que salen del país por la adquisición de productos con patente extranjera, y que México requiere cotidianamente, sería sencillo darse cuenta de la necesidad imperiosa de apoyar el desarrollo científico nacional como generador de recursos y ahorrador de deuda externa.

Sin embargo, ese tipo de inversiones no es recuperable a corto ni a mediano plazo, de ahí la dificultad para superar los restringidos planes sexenales. Basta comparar lo que en su momento hizo el Japón de la posguerra o la India de los setenta, quienes inundaron las universidades norteamericanas con estudiantes que, 20 ó 30 años después, han formado la masa crítica necesaria para generar academias fuertes, impulsoras de la ciencia y tecnología en sus países. Para hablar del futuro de la ciencia en México, es preciso hacer un análisis de su evolución y a partir de entonces, visualizar el panorama que presenta

Antecedentes históricos

México fue dominado por la ignorancia católico-medieval hasta la segunda mitad del siglo XIX, cuando a raíz de la Guerra de Reforma (1857-1861) sobrevino el liberalismo juarista y surgieron las primeras sociedades científicas. Durante el Porfiriato, las condiciones en el ámbito científico mejoraron cuando los hijos de familias de clases altas



Nuestro país ha sufrido varias crisis económicas sexenales, que han tenido graves consecuencias en la caída de los salarios a nivel nacional y la falta de recursos para financiar investigaciones.

estudiaban en Francia y Estados Unidos, lo cual permitió que los conocimientos de la época llegaran a nuestro país; sin embargo, no fue sino hasta el gobierno de Lázaro Cárdenas cuando comenzó un resurgimiento de la actividad científica, al crearse varios institutos, como la Facultad de Ciencias en la UNAM. Fue entonces cuando la figura de investigadores mexicanos formados en el extranjero comenzó a rendir frutos. No obstante, el problema central era la gran cantidad de campos por atender, contra el reducido número de estudiantes que egresaban de las universidades y menos aún los que decidían dedicarse a la investigación científica.

En esa época, la UNAM adquirió su autonomía e inició sus actividades el Instituto Politécnico Nacional; además, se crearon diversas universidades estatales, aunque su función fue durante mucho tiempo, y aún es en gran medida, la de formar profesionistas, más que generar conocimientos mediante la investigación científica. El poco apoyo a la formación de recursos humanos y la falta de una política nacional sobre ciencia y tecnología, dejaron únicamente en manos de la UNAM y el IPN la formación de científicos, que casi siempre complementaban su preparación en Estados Unidos y Europa, lo cual favoreció la aparición de institutos como el CINVESTAV, IMP, ININ, etcétera.

Bajo estas condiciones, en poco tiempo se multiplicó el número de estudiantes dedicados a la ciencia, y en 1971 el gobierno federal fundó el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para administrar e impulsar la actividad científica. Pero, como siempre, hubo un problema, esta institución y su obsesión por aplicaciones inmediatas y por definir áreas de investigación prioritarias, comenzó a divorciarse de la comunidad científica y ésta del contexto nacional.

Panorama actual

Nuestro país ha sufrido varias crisis económicas sexenales, que han tenido graves consecuencias en la caída de los salarios a nivel nacional y la falta de recursos para financiar investigaciones. Como respuesta el Estado creó el sistema nacional de investigadores (SNI), cuyo acierto fue frenar la caída de los indicadores y hacerlos crecer lentamente; no obstante, analizando los artículos publicados y lo que se distingue en nuestro país, cabe destacar un “pero”: es verdad que el SNI ayudó a frenar los indicadores, sin embargo únicamente benefició y sigue beneficiando a los gremios en su profesionalización, y se ha olvidado de quienes inician su periodo de formación, ignorando que muchos de los aspirantes a científicos, o sus familias, no cuentan con los recursos económicos necesarios para formarse.

Entre las funciones instrumentales y no instrumentales que se pueden atribuir al Desarrollo Científico Nacional, están los criterios introducidos por dicha institución y se manifiestan en las evaluaciones, las cuales han obligado a publicar trabajos básicamente en revistas internacionales, sin que existan los mecanismos para que los conocimientos puedan ser aplicados en nuestro país.

Mientras que en México ha crecido el número de científicos, las condiciones para generar ciencia y tecnología no lo han hecho al mismo ritmo, y la prueba son los bajos salarios del científico, si los comparados con algunos países, en los que esta cantidad se multiplica varias veces. El Congreso de la Unión asignó el 0.4% del PIB a la ciencia y tecnología, cuando la UNESCO recomienda como mínimo el 1%. Por ello no debe sorprendernos que tengamos pocos investigadores de calidad, además de investigadores con escasa preparación, aunque tal vez esto no sea culpa del PIB.

Algo importante es ver cómo han aumentado los investigadores en México y con ello los centros de investigación y al mismo tiempo han surgido muchas instancias académicas, programas de posgrado e incluso sistemas educativos de baja calidad, donde la burocracia, la inadecuada formación científica y la apatía de sus miembros, aunado al sindicalismo mal entendido, se sobreponen a la investigación y la enseñanza. Nuestro país ha sufrido como un cáncer, la mala calidad en la enseñanza y el empobrecimiento de la educación científica; ¿pero, cuáles son esas causas? Me atrevo a mencionar algunas:

- La llegada de políticos profesionales a las rectorías de instituciones de educación superior, quienes son impuestos por los gobernantes sin mediar un criterio académico.
- La separación entre la educación y la ciencia en la formación de recursos humanos. La mayoría de los profesores de nivel superior se han convertido en reproductores de libros de texto, eliminando su capacidad de innovar; el porcentaje de investigadores que imparten cátedra ha disminuido e incluso es nula a nivel medio superior.
- La separación de la cultura nacional. Muchos aspectos fundamentales en

la ética de la ciencia contemporánea son totalmente opuestos a la cultura mexicana, favorecida por el sistema político.

En pocas palabras, si en México alguien se quiere dedicar a la ciencia, tiene en su contra a la burocracia, el tiempo y una maltrecha economía personal. Desafortunadamente, lo anterior ha provocado que el científico sea visto como bicho raro y un parásito social por los administradores públicos, y no como un coadyuvante del desarrollo.

Peor aún

Ramón Mariaca Méndez menciona que debe apreciarse cómo aumenta el número de egresados desempleados que tocan las puertas de los posgrados de excelencia del CONACYT, buscando sobrevivir un tiempo a costa de una beca y no en pos de una formación como científico. Otro aspecto es la gran brecha generadora de conocimiento y tecnología y los potenciales benefactores de esos insumos. Desde hace dos sexenios, se ha pretendido cerrar este hueco exigiendo al investigador que genere productos terminados y patentados para la industria, olvidando casi totalmente al campo y a la gente que vive de él. En contraposición, los industriales nacionales prefieren comprar patentes extranjeras o copiar productos, en vez de fomentar el progreso científico nacional.

Mientras tanto, la perspectiva en Europa, Asia y los Estados Unidos ha sido muy diferente. En la actualidad, estos continentes, en particular el americano, han sido promotores de la investigación, con inversiones hacia el sector educativo, como universidades, instituciones, y de la formación de recursos humanos. Los países asiáticos, desde la posguerra, han apostado por la educación de sus habitantes y en consecuencia, las políticas que poseen están encaminadas

al desarrollo tecnológico. Estos países tienen un alto porcentaje de estudiantes distribuidos en todo el mundo, para complementar su formación académica y científica mientras que en nuestro país solamente dos de cada 100 estudiantes logran esta meta. Es una situación muy grave para nuestro desarrollo, y si la clase política no se preocupa por hacer nuevas reformas que impulsen la educación, cada vez nuestro país estará lleno de ignorantes, de gente oportunista, y con una economía frágil.

Conclusiones

Hasta hoy, el panorama no es muy alentador, tenemos que esforzarnos por mejorar la educación, fomentar la lectura, difundir más programas culturales y científicos para nuestro hijos, definir como gremio las prioridades de los diversos campos de la investigación y el desarrollo de la ciencia y la tecnología, con programas a mediano y largo plazo, a fin de evitar que sean los políticos quienes determinen el qué, cómo, cuándo y para qué de nuestro quehacer en la formación de recursos humanos.

Bibliografía...

Bajpai, P. (1999). "Application of enzymes in the pulp and paper industry". *Biotechnol. Prog.* **15**:147-157.

Beg Q. K., M. Kapoor, L. Mahajan, G.S. y Hoondal (2001). "Microbial xylanases and their industrial applications: a review". *Applied Microbiology Biotechnology* **56**:326-338.

de Vries R. P. y Visser J. (2001). "Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**:497-522.

Durán, N. (1994). *Aspergillus* sp 2M1 xylanase: production, characterization and application in the pulp and paper industry. *Advances in Bioprocess Engineering*, 489-494.

Gutiérrez-Correa y Tengerdy, R. P. (1998). "Xylanase production by fungal fermentation



Producción de **Biosurfactantes** en Función de la Remoción de **Queroseno por Bacterias Fijadoras de** **Nitrógeno**

Josefina Pérez Vargas *
Graciano Calva Calva **

Resumen

Se presenta la producción de un biosurfactante por bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico (BFNA), que utilizan hidrocarburos como única fuente de carbono. En estudios previos se encontró que durante la biodegradación de hidrocarburos estos microorganismos producen un exopolímero, que modifica la tensión superficial del medio de cultivo. En este trabajo, se muestran los resultados de la producción de ese biosurfactante en cuanto a la remoción de queroseno por bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico, aisladas de sitios contaminados por derrames de petróleo crudo. Estos microorganismos mantuvieron la correlación lineal positiva entre la fijación de nitrógeno, la remoción de hidrocarburo y la producción del exopolímero que proporciona una mejor dispersión del hidrocarburo en el medio de cultivo. La extracción e identificación parcial del compuesto, indica que podría ser una lipoproteína. El rendimiento de este compuesto en el cultivo que mostró mayor índice de emulsificación, fue de 0.5 g/l.

Acerca de los autores...

* Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec.
** CINVESTAV/IPN

Introducción

Algunas bacterias, levaduras y hongos son capaces de producir biosurfactantes, especialmente durante su crecimiento en sustratos orgánicos insolubles en agua. Estos biosurfactantes generalmente son excretados al medio de cultivo, reduciendo la tensión superficial y propiciando la formación de emulsiones estables de aceite en agua. Así, los biosurfactantes son moléculas anfipáticas microbianas con propiedades biológicas aplicables a varias industrias y procesos. Debido a su diversidad estructural (por ejemplo, glicolípidos, lipopéptidos, ácidos grasos, etcétera), baja toxicidad y biodegradabilidad, son moléculas ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica para la preparación de cosméticos, y en el procesamiento de alimentos como agentes emulsificantes, humectantes, conservadores y detergentes.

Además, tienen aplicaciones terapéuticas como agentes antimicoplasma, antitumores, antifúngicos y antivirales, además de inhibir el crecimiento del virus simple del herpes y el virus de la influenza. También se utilizan como repelentes de insectos, antiácidos, colorantes de cabello, desodorantes, shampoo, productos para bebé, para la depilación, artículos de belleza y la salud, entre otros. En estudios previos, se encontró que los microorganismos muestran una correlación lineal entre la fijación de nitrógeno y la remoción del hidrocarburo (Pérez *et al.*, 2000). Durante la biodegradación de hidrocarburos, los microorganismos producen un exopolímero que modifica la tensión superficial del medio de cultivo. En este trabajo se exponen los resultados sobre la producción de ese biosurfactante respecto a la remoción de queroseno por bacterias de vida libre, fijadoras de nitrógeno atmosférico aisladas de sitios contaminados por derrames de petróleo crudo.

Materiales y Métodos

Material biológico

Los microorganismos fueron aislados de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo de la zona de Tabasco, y los proporcionó el Laboratorio de Ingeniería Metabólica del Departamento de Biotecnología del CINVESTAV. Los cultivos se mantuvieron en agar nutritivo y en medio Rennie líquido fresco, conservados en medio Rennie (1981) con glicerol bajo refrigeración a -20 °C.

Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (BFNA) de vida libre

Los cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico se aislaron de los suelos contaminados con petróleo mediante su crecimiento en medio líquido de Rennie (1981), a 28 °C y 120 rpm por un periodo de cuatro días. Transcurrido ese tiempo los cultivos se colocaron en un medio fresco de Rennie modificado.

Cultivos de BFNA degradadores de hidrocarburos

Se sustituyeron las fuentes convencionales de carbono por 5 g/L de queroseno y se incubaron por cuatro días para seleccionar aquellos con capacidad de crecer en el hidrocarburo.

Índice de emulsificación (IE24)

La determinación del índice de emulsificación se realizó de acuerdo con el método desarrollado por Cooper y Goldenberg (1987).

Tensión superficial

La determinación se realizó con un tensiómetro CSC-DuNoüy Modelo

70535. La muestra se centrifugó a 8000 rpm durante 12 minutos para separar la biomasa del sobrenadante, y evitar interferencias al momento de realizar la medición. Las lecturas de las muestras fueron determinadas por duplicado. Como blanco de referencia se utilizó agua destilada.

Remoción de hidrocarburos

Para los cultivos de BFNA los ensayos se realizaron en medio de Rennie, en un agitador orbital a 120 rpm, y 28 °C durante 72 horas. Posteriormente, se pasaron a medio de Rennie modificado, sustituyendo la fuente de carbono por queroseno, a una concentración de 5 g/l. Se incubaron a 120 rpm, y 28 °C, durante 14 días. La utilización del hidrocarburo se reportó como remoción, usando el método EPA 8015, modificado de acuerdo con Pérez *et al.* (2000, 2002) para la evaluación. Las muestras fueron obtenidas por duplicado, y re-suspendidas y diluidas en hexano, para el caso del queroseno, para su análisis en el Cromatógrafo de Gases.

Extracción del biosurfactante

Los cultivos de BFNA que presentaron índice de emulsificación, se crecieron en medio de Rennie a 120 rpm, 28 °C durante 72 horas. Posteriormente se pasaron a medio de Rennie modificado, sustituyendo la fuente de carbono por queroseno (5 g/L) y fueron incubados a 120 rpm, 28 °C, por un periodo de cinco a 14 días en agitación. La extracción del biosurfactante se realizó de acuerdo con el método reportado por Sim *et al.* (1997), empleando muestras por duplicado en cada punto y esterilizando los cultivos para la separación de la biomasa por centrifugación y evitar interferencias en la obtención del producto.

Separación del biosurfactante por cromatografía en capa Fina (TLC)

La determinación del tipo de componentes que constituyen el biosurfactante, será determinada de acuerdo con el método reportado por Sim *et al.* (1997).

Determinación de proteína y carbohidratos

Se utilizará la determinación analítica, la técnica de Lowry o Bradford para identificar las proteínas y la de Antrona o Folin para establecer los carbohidratos.

Resultados

Producción de biosurfactante en función de la remoción de queroseno

La producción de biosurfactante se evaluó mediante el índice de emulsificación (IE24) y la tensión superficial a partir de la remoción de queroseno. Se probaron siete cultivos crecidos en medio de Rennie modificado, utilizando queroseno como única fuente de carbono. Según el perfil del índice de emulsificación (Figura 1), cinco de los siete cultivos probados mostraron la producción de un exopolímero en un periodo de cuatro días. El cultivo identificado como CC (cultivo crema) mostró el mayor índice de emulsificación (7),

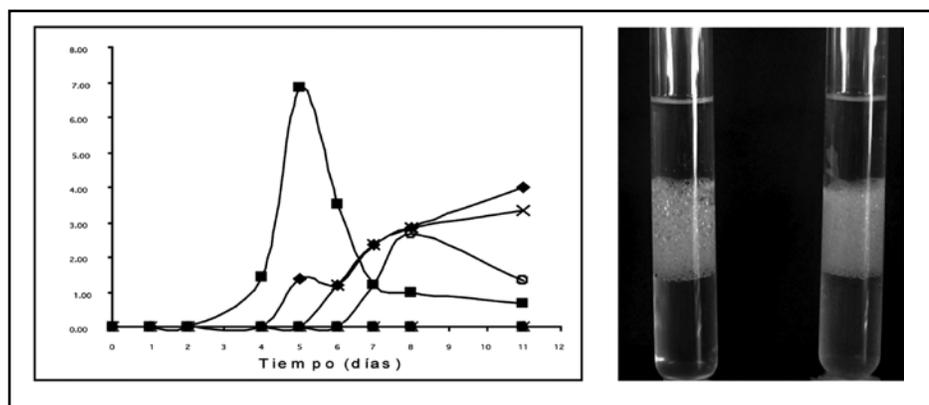


Figura 1. Índice de emulsificación en función del tiempo para cultivos de BFNA crecidas en queroseno como única fuente de carbono (A) y emulsión formada por el medio de cultivo de la colonia crema (CC) al tiempo cero (derecha) y después de 72 horas (izquierda) de mezclarlo con queroseno. ■ CC (cultivo crema), ♦ CB (cultivo blanco), × CS (cultivo salmón), ○ CA (cultivo amarillo), ▲ CN (cultivo naranja), *CT (cultivo transparente), • CAC (cultivo amarillo I).

lo cual físicamente se observó por su capacidad de mantener una emulsión del medio de cultivo con el hidrocarburo por más de 72 horas (Figura 1B). En los cultivos CB y CS la producción del exopolímero se mantuvo por ocho días, pero no llegaron a niveles similares a los del cultivo.

Los resultados anteriores, no correlacionaron bien con los de la tensión superficial (Tabla 1), los cuales fueron similares para todas las cepas. Sin embargo, la remoción de hidrocarburos al final de 12 días fue superior al 60 por ciento para todos los cultivos, y cercana o mayor al 90% para las cepas CC y CA, sugiriendo la presencia del biosurfactante en algún momento del ciclo de cultivo, que según la Figura 1, depende de la cepa. En la tabla también se observa una disminución en la tensión superficial al final del ciclo de cultivo y por tanto una mayor disponibilidad del hidrocarburo, lo cual se refleja en la remoción tan alta presentada para cultivos puros. Así, es notable que los cultivos tienen un elevado poder degradativo con el biosurfactante producido.

Obtención del Biosurfactante e Identificación por Cromatografía en Capa Fina

Se realizaron diferentes pruebas para determinar el mejor proceso de extracción de los agentes tensoactivos y se encontró que el mejor solvente fue el acetato de etilo, lo cual concuerda parcialmente con lo reportado por Sim *et al.* (1997), quienes usaron una mezcla de cloroformo/metanol para la extracción del biosurfactante producido por cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* crecidos en aceite de maíz.

Para evitar cualquier interferencia debida a microorganismos, las muestras fueron esterilizadas; a las mezclas se

Tabla 1. Tensión superficial y remoción de queroseno por BFNA

CULTIVO	Ts Inicial (Dinas/cm)	Ts final (Dinas/cm)	Remoción (%)
CC	22	10.3	89
CB	20	8	67
CS	31	15	84
CA	27	14	95

CC (cultivo salmón), CB cultivo blanco, CC cultivo crema, CA cultivo amarillo. TS tensión superficial.

les extrajo con acetato de etilo, utilizando una relación muestra/solvente de 2:1. Las extracciones se realizaron por duplicado. Se tomaron 200 ml de medio de cultivo que fueron centrifugados a 8000 rpm durante 12 minutos. El sobrenadante se trasladó a un embudo de separación de 500 ml. Se adicionaron 50 ml de acetato de etilo y se agitó vigorosamente durante 3 minutos. Se dejó reposar el embudo durante 30 más, hasta la separación de las fases. Los extractos se evaporaron para calcular el rendimiento del extracto crudo. De igual forma, se tomaron muestras para

realizar una separación por cromatografía en capa fina utilizando como revelador vapores de yodo.

Los resultados que se presentan en la Figura 2 confirmaron que la presencia del biosurfactante mantiene en solución adecuadamente al queroseno. La cantidad de biosurfactante producido después de la esterilización y la separación de la biomasa del medio de cultivo estos cultivos son los que se extrajeron y la Figura 2C muestra la cromatografía en capa fina de biosurfactante obtenido de acuerdo con la metodología de Sim

et al. (1997). Los rendimientos obtenidos para este compuesto con base en la metodología utilizada, dio como resultado 0.5 g/L para el cultivo CC y para los otros cultivos fue de 0.2 g/L. Dichos rendimientos se han obtenido para los extractos crudos de los cultivos.

De acuerdo con los resultados de cromatografía en capa fina, el exopolímero en ambos cultivos podría corresponder parcialmente a un glicopéptido y no a un glicolípido, como lo encontrado por Sim et al., para los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*. Esta hipótesis se estudió mediante la determinación de proteínas y carbohidratos en el exopolímero extraído usando los métodos de Lowry y Bradford, y por Antrona o Folin, respectivamente, obteniéndose resultados positivos en ambos casos. Actualmente, se están realizando los estudios respectivos para determinar la estructura y caracterización del compuesto.

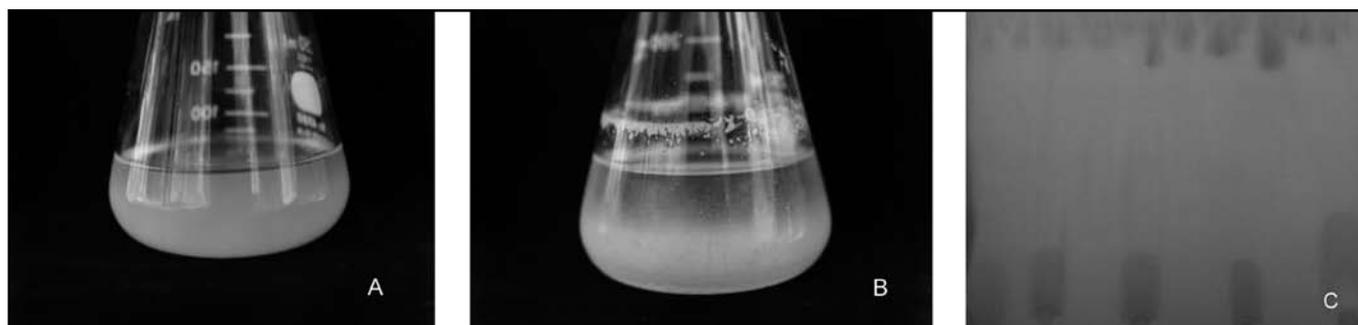


Figura 2. Imágenes de los cultivos productores de exopolímeros después de la esterilización de cultivos de la colonia CC (A) y CS (B) crecidos en queroseno. El exopolímero respectivo fue extraído y resuelto por cromatografía en capa fina (C), usando como solventes una mezcla de cloroformo/metanol/ácido acético 65:15:2 y revelada con yodo para la evaluar la presencia del exopolímero.

Conclusiones

Los cultivos aislados de suelos contaminados con hidrocarburos, son degradadores de queroseno y bacterias de vida libre fijadora de nitrógeno.

De siete cultivos probados, sólo cinco tienen la capacidad de degradar queroseno en un intervalo de 60 al 95%, y producen un biosurfactante en un periodo de cinco días.

Se sabe que los compuestos que forman, pertenecen a las lipoproteínas y fueron producidos de manera extracelular, lo que facilita su recuperación, a través de la metodología utilizada. La identificación de los compuestos aún se encuentra en estudio.

Bibliografía...

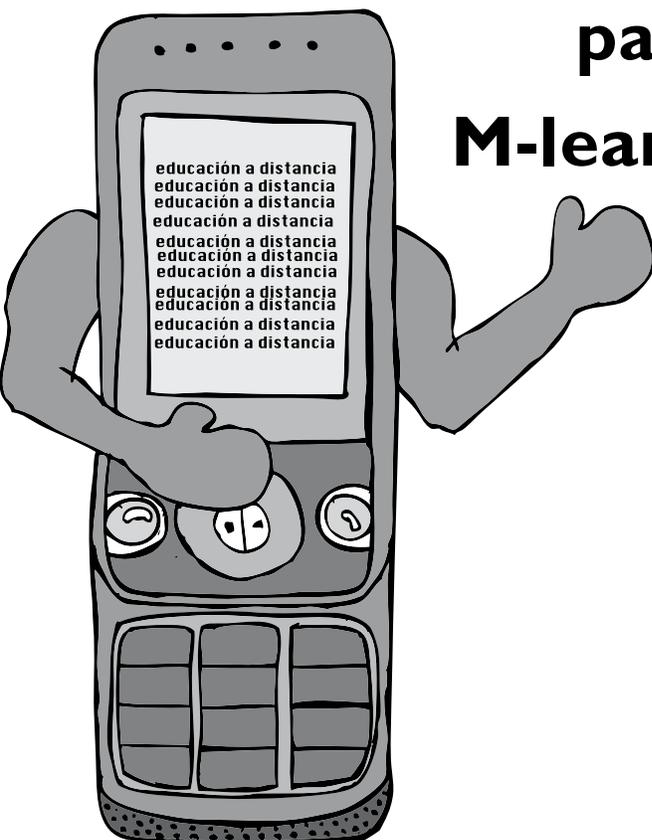
- Cooper D. G. y Goldenberg B. G. (1987). Surface active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(2) : 224-229
- Pérez V.J. (2002). Degradación microbiana de queroseno. Tesis doctoral, CINVESTAV. Depto. de Biotecnología, México D.F.
- Pérez V.J., Esparza G. F., Ferrera C. R.; Poggi Varaldo H.M.; Rodríguez Vázquez R. Calva C. G. y Ríos L. E. (2000). Nitrogen fixing bacteria capable of utilizing kerosene hydrocarbons as a sole carbon source. *Water Sci. Technol.* 42(5-6) :407-410
- Rennie R.J. (1981). A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can. J. Microbiol.* 27(1) : 8-14
- Sim L., Ward O.P. y Li Z.Y. (1997). Production and characterization of a biosurfactante isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19 : 232-238

Tecnologías para la Implementación del M-learning (Aprendizaje Móvil)

(Primera de dos partes)

Ing. Irene Aguilar Juárez *

M. en C. Mercedes Flores Flores **



Palabras clave: M-learning, teléfonos celulares, educación a distancia, ingeniería de software.

Resumen

Con el surgimiento de la comunicación móvil, la sociedad, pero sobre todo los jóvenes, han incorporado a su vida cotidiana el uso de dispositivos móviles que procesan información personal y facilitan su comunicación en todo momento y lugar. El empleo de estos dispositivos móviles con fines educativos genera un nuevo concepto: el aprendizaje móvil; esta tecnología reciente, es resultado de tres áreas del conocimiento humano, las telecomunicaciones, la educación a distancia y la ingeniería de software. La integración de esas tres áreas, genera aplicaciones nuevas con características propias y problemáticas particulares. Enseguida, se describe la relación de cada una de estas áreas con el aprendizaje móvil y los problemas con los que se enfrenta dicha tecnología didáctica para sistematizar la utilización de estas aplicaciones y lograr su uso extensivo.

Acerca de los autores...

*Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Texcoco.

**Tecnológico de Estudios Superiores Ecatepec

I. Introducción

Las comunidades educativas viven un proceso de reestructuración educativa ante las demandas sociales cada vez mayores; la población en edad escolar aumenta y la sociedad requiere nuevos perfiles de egreso en los que el manejo de la información debe ser intensivo. Sin embargo, las instituciones públicas reciben presupuestos limitados que les dificultan satisfacer las necesidades que enfrentan, por lo que, ante esta situación, éstas generan cambios en los modelos pedagógicos de las universidades para apoyarse de las Tecnologías de la Información (TI) obteniendo así educación más eficiente y actualizada.

La teleeducación es una herramienta que apoya a la educación superior y permite a las universidades ofrecer nuevos servicios de enseñanza a sus alumnos o egresados, facilita la educación continua a los egresados, quienes al incorporarse al mercado laboral se ven imposibilitados de asistir a cursos presenciales de actualización.

El uso de la tecnología informática en la educación es un camino que puede facilitar el avance para la población en general, mejorando los índices educativos de las naciones, sobre todo en aquellas que se encuentran rezagadas por su incipiente desarrollo tecnológico; aunque esta novedosa modalidad de aprendizaje es prometedora, requiere nuevos paradigmas educativos que implementen roles diferentes a instituciones, profesores y alumnos.

El concepto m-learning surge de unir el aprendizaje a distancia con la movilidad que ofrecen los dispositivos portátiles; de esta unión surge una nueva tecnología educativa con retos particulares, los cuales conviene analizar a fin de encontrar soluciones que permitan implementar esta tecnología, como una opción más para el aprendizaje, optimizando los recursos de las universidades.

2. Antecedentes

Las telecomunicaciones evolucionan continuamente, hoy día se tiene la posibilidad de usar dispositivos de comunicación móvil que ofrecen servicios digitales diversos, como el envío y recepción de mensajes, imágenes y video; la aceptación de tales aparatos en la sociedad ha sido un éxito desde 1995, cuando salieron al mercado los primeros teléfonos celulares con prestaciones elementales de transmisión de voz. En la actualidad, a escala mundial la cantidad de teléfonos celulares es mayor al número de computadoras; igualmente, el mercado de los asistentes personales o PDA crece significativamente; la ventaja que tienen estos dispositivos de conectarse a través

de infrarrojos o Bluetooth, permite el uso de aplicaciones independientes de conexión cableada y ofrecen una movilidad creciente al usuario.

La utilización de dispositivos móviles va en aumento y, sobre todo, el teléfono celular se incorpora a la vida cotidiana de las personas. En los Estados Unidos, la penetración del dicho aparato entre los estudiantes de *high schools* es del 75% y en los *colleges* es de 90%; con la reducción de los precios y el aumento de desempeño, es posible concluir que la penetración en un futuro próximo será del 100% [Prensky, 2005].

Las aplicaciones para los dispositivos móviles son tan variadas como lo son para las computadoras, y se incorporan a nuevos esquemas de comunicación empresarial y social. El área educativa no queda excluida de esta evolución tecnológica y con el uso de las Tecnologías de la Información (TI), modifica continuamente los servicios que ofrece, integrando a la enseñanza los avances tecnológicos que surgen en la sociedad.

En un mundo globalizado, las economías de los países experimentan un gran cambio estructural, que demanda cada vez más empleados en el área de la información y menos trabajadores industriales y agrícolas; además, las tecnologías informáticas permiten que la Universidad se posicione en diversos nichos del mercado, de los que atiende con tecnologías tradicionales. [Casasús, 2006]. Ahora, en los alumnos se presentan las siguientes disyuntivas:

- Licenciatura / Postgrado / Actualización
- Estudiantes de tiempo completo / Estudiantes de tiempo parcial
- Formación de una sola vez / Formación para la vida
- Formación presencial / Formación remota.

El nuevo escenario educativo hace que la mayoría de las instituciones de enseñanza universitaria se esfuercen por introducir el uso de las TI en la enseñanza y en el aprendizaje, en términos de adecuación curricular, procesos y resultados, para adaptarse a una nueva dinámica social y como motor para la calidad en la educación. [Guàrdia, Sangrà, 2006].

La formación remota en las Universidades permite brindar servicios educativos a mayor número de personas, al incluir a los alumnos de tiempo parcial que buscan en las Universidades actualización, adquisición de competencias laborales o un nuevo grado académico.

En México por ejemplo, la población nacional en edad de formación universitaria (18 - 24 años) es alrededor de 14 millones de personas y el sistema educativo nacional sólo atiende a 2.3 millones. Las funciones tradicionales de las universidades implican costos lineales entre capacidad de atención a la demanda y costo de inversión, así como poseer espacios físicos para la transmisión de conocimiento, acervos documentales, laboratorios y talleres, lugares para la concentración de investigadores, entre otras necesidades [Casasús, 2006].

El incremento de la población estudiantil obliga a las instituciones a invertir en la infraestructura necesaria para atenderla. Las Tecnologías Informáticas (TI) ofrecen a las instituciones otra manera de afrontarla, elevando la capacidad de atención.

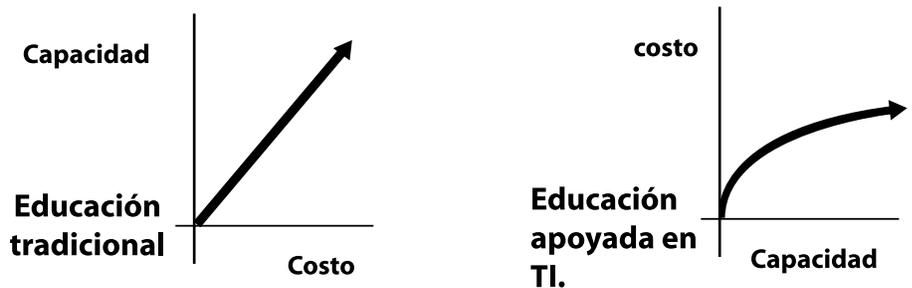


Figura 1: Comparativa de inversión en una institución educativa entre educación tradicional y educación apoyada en TI. [Casasús, 2006]

Las instituciones de educación superior se enfrentan a nuevos paradigmas, se replantean los procesos de enseñanza – aprendizaje, la estructura del currículo, y las formas de evaluación; la sociedad requiere mayor cobertura y la empresa exige profesionistas con mayor dominio en las tecnologías de la información y altos perfiles de egreso.

El aprendizaje móvil es una tecnología reciente que puede agregarse a los servicios educativos de las Universidades, para optimizar el uso de los materiales didácticos generados en ellas y aumentar la difusión de los conocimientos.

3. M-learning

El m-learning surge en el contexto mundial gracias a que los asistentes personales y los teléfonos celulares presentan las siguientes características:

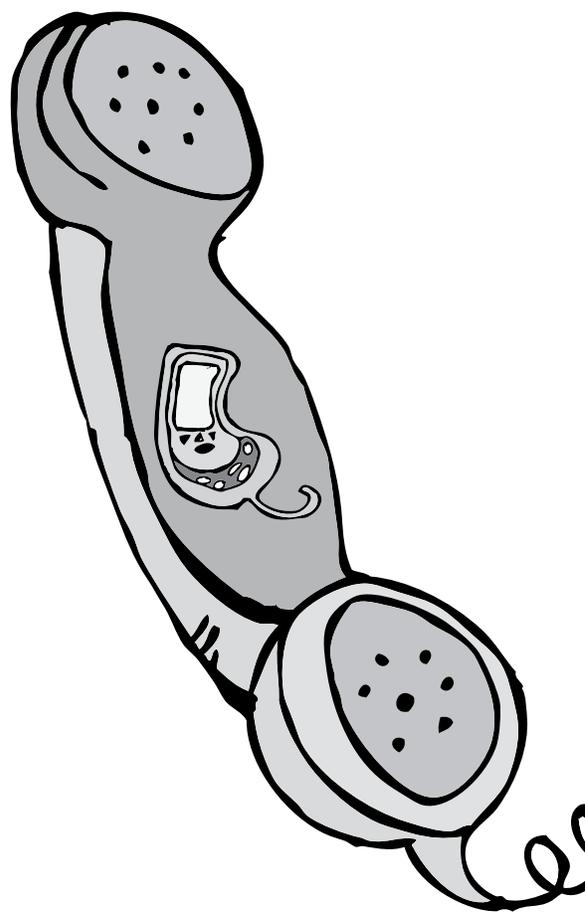
1. Aumento en la capacidad de procesamiento y almacenamiento.
2. Reducción de tamaño y peso.
3. Integración de conexión inalámbrica.
4. Integración de baterías con mayor almacenamiento de energía y menor peso
5. Soporte a software de aplicación no administrado.

La posibilidad de usar un dispositivo móvil en la vida diaria, hace factible tener a la mano información personal en cualquier momento y lugar; si estas ventajas las incorporamos en el proceso enseñanza-aprendizaje, el profesor podrá usar estos dispositivos como un nuevo canal de comunicación con sus alumnos, y ellos a su vez, contarán con una nueva herramienta para consulta, entrenamiento, repaso o resolución de problemas que les facilite la aprehensión del conocimiento.

El aprendizaje móvil aún se encuentra en estado embrionario, razón por la que se debe considerar la experiencia obtenida en los ambientes de aprendizaje y la educación a distancia para lograr avances sustanciales. Esta nueva área, se basa en los conocimientos de las siguientes disciplinas:

- Educación a distancia y modelos pedagógicos.
- Telecomunicaciones.
- Ingeniería de software y desarrollo de aplicaciones.

La relación de estas disciplinas en el aprendizaje móvil, es estrecha, y una depende de otra, ya que las aplicaciones deben ser trabajadas bajo un diseño ins-



truccional fundamentado en modelos pedagógicos consistentes, metodologías de desarrollo aprobadas por la ingeniería de software y considerando las limitaciones y ventajas de telecomunicación propias de esos dispositivos.

3.1. Telecomunicaciones

Desde la década de los 80, la computación cambió drásticamente el procesamiento de la información; con la posibilidad de conectar dos computadoras, la optimización de los recursos informáticos y la comunicación hicieron factible automatizar un gran número de procesos de negocios, a tal grado que en la actualidad es prácticamente imposible operar las grandes y medianas empresas con dispositivos manuales.

A partir del nacimiento de Internet, éste se convirtió en la columna vertebral de la comunicación internacional, y el avance tecnológico de los equipos diversificó los mecanismos de conexión; hoy día, los dispositivos que acceden a la red se pueden clasificar en tres grandes grupos: fijos, portátiles y móviles; estos últimos, presentan las siguientes características: “Bajo esta clasificación se encuentran los nuevos dispositivos móviles de acceso a la red. Tienen una pantalla que varía entre 1 y 6 pulgadas y un teclado limitado. Su peso no sobrepasa el medio kilo y tienen batería. La puesta en marcha de los servicios es casi instantánea. Son dispositivos de bolsillo fáciles de utilizar. Actualmente tenemos teléfonos móviles con conexión WAP y organizadores digitales personales llamados handhelds. Es esta nueva

generación de dispositivos móviles la que tendrá un crecimiento más grande durante los próximos años.” [BerbeL, 2000].

Los teléfonos móviles son los aparatos más complejos y sofisticados que hemos incorporado a nuestra vida cotidiana. Para comprimir y descomprimir señales digitales codificadas, se tienen que procesar millones de cálculos por segundo.

El uso de beepers o radiolocalizadores (de una sola vía), iniciaron la comunicación móvil masivamente, ya que los usuarios tienen mayor posibilidad de contratar servicios de radiolocalización que de comprar un radio CB. Inicialmente, los servicios fueron muy limitados, pues los beeper sólo servían para envío de mensajes, los cuales no podían ser contestados con el mismo equipo.

Un teléfono celular realmente no es un teléfono, sino un aparato análogo a un radio CB, la diferencia es que un radio CB transmite con una sola frecuencia, por lo que no lo usan simultáneamente dos personas; primero una transmite y después la segunda persona responde, el teléfono celular usa una frecuencia para enviar y otra para recibir “Un aparato de radio CB tiene 40 canales, un teléfono móvil comunica a través de millares. No obstante, como los teléfonos móviles funcionan en un sistema de células, y un radio CB transmite directamente para otro aparato, la radio tiene que ser mucho más fuerte, a pesar de tener un alcance de poco más de seis kilómetros” [Teléfonos-móviles, 2006]

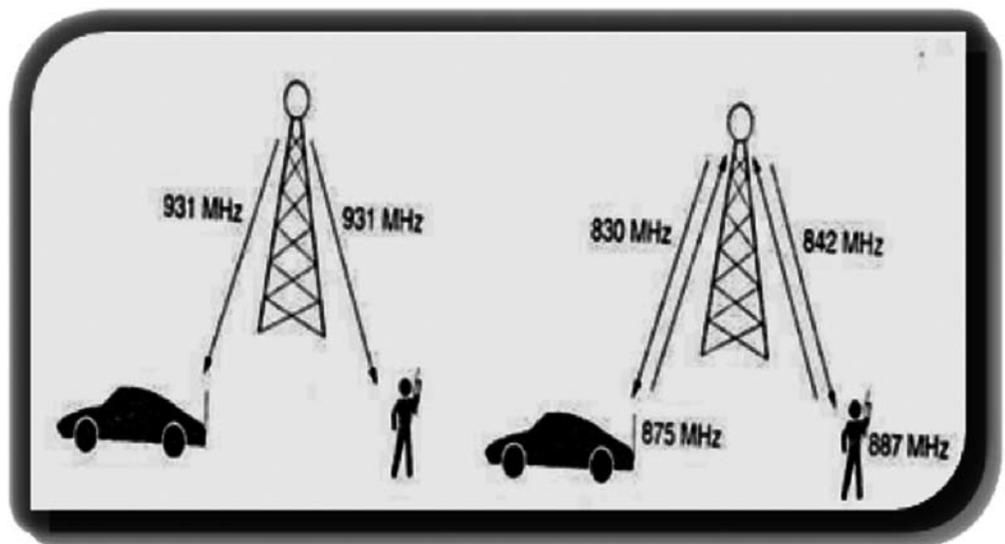


Figura 2: Comunicación unidireccional (beeper), Comunicación bidireccional (teléfono móvil) (Tanenbaum, 1996)

La red de telefonía celular se caracteriza por optimizar las bandas de frecuencias, dividiendo a las ciudades en zonas pequeñas llamadas células (generalmente de forma hexagonal); cada una posee una antena de transmisión, que administra las frecuencias entre los usuarios. Como existe esta división, se puede usar una misma frecuencia con varias conexiones distintas, una en cada célula de la ciudad.

Cada célula consigue utilizar varias decenas de canales, lo que da la posibilidad de comunicar a varias decenas de personas simultáneamente en cada una. Cuando un usuario se mueve de una célula a otra, utiliza la frecuencia de la nueva célula, dejando libre la anterior para otro usuario.

Como las distancias de transmisión no son muy grandes, los teléfonos móviles pueden transmitir con poca energía, proveída por pequeñas baterías que ofrecen un tamaño y un peso reducido. Por lo tanto, son las células, las que hacen posible los teléfonos móviles como los conocemos hoy.

Cuando el operador recibe una llamada, intentará encontrar el teléfono móvil a que se destina. Antes del roaming, el operador llama al teléfono a través de una señal masiva para todas las células de la región que cubre, hasta encontrar el teléfono, e informa el teléfono móvil y la estación base de la célula de la frecuencia en que opera.

Cuando el aparato móvil se aproxima al límite de la célula, la estación percibe que la señal es más débil, mientras la estación de la célula siguiente descubre que la señal se está fortaleciendo. Por fin, el teléfono móvil recibe la orden de pasar de la frecuencia de la primera a la frecuencia de la célula a la que se aproxima. A esta operación se llama el *handoff*.

Los teléfonos celulares, como toda máquina, están integrados con apenas algunos componentes, los cuales se listan a continuación:

- Un micrófono microscópico
- Un altavoz
- Una pantalla de cristales líquidos o plasma
- Un teclado
- Una antena
- Una batería
- Una placa de circuitos.

La ventaja real de estos aparatos, es su capacidad de procesamiento y conexión, en un equipo de pequeñas dimensiones muy manejable para cualquier usuario. En la imagen siguiente, se observa la estructura interna de los componentes de un teléfono celular común.

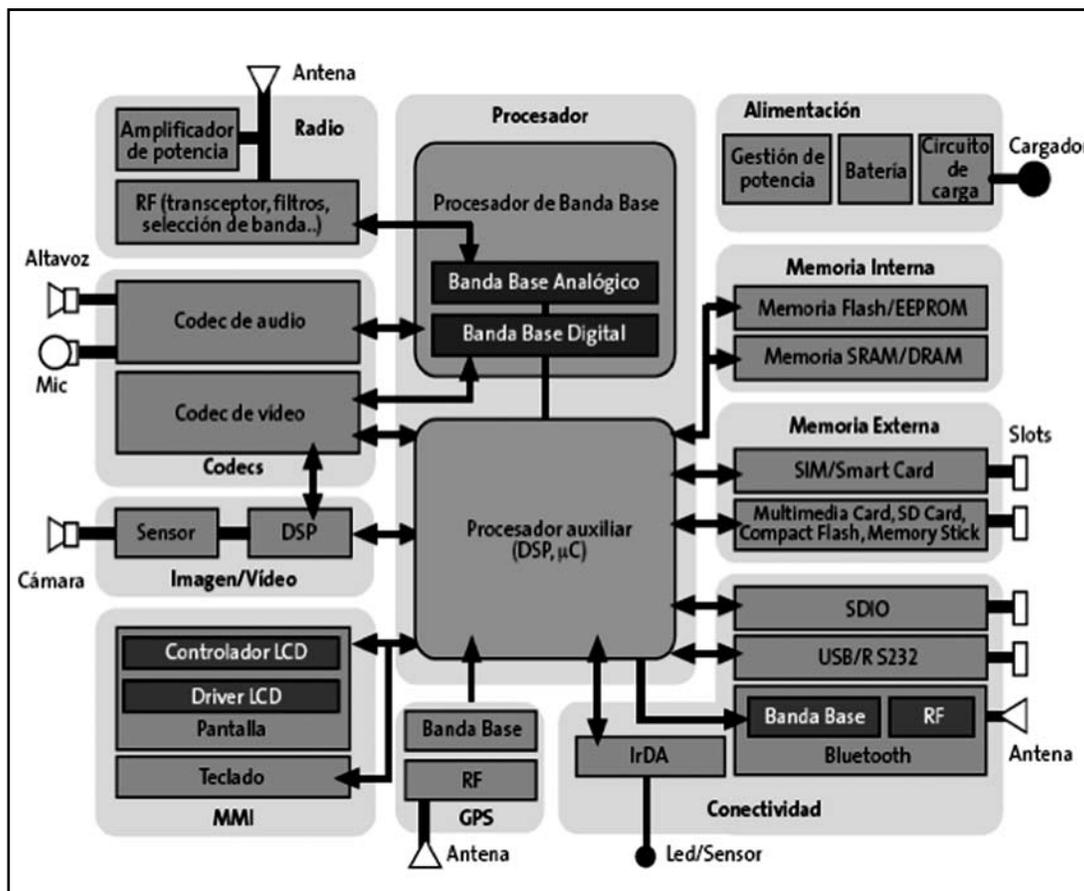


Figura 3: Estructura de un teléfono celular.

El móvil posee un microprocesador que procesa cálculos a gran velocidad, llamado DSP, o “Digital Signal Processor” (Procesador Digital de Señales). Este procesador hará toda la compresión y descompresión de los datos a la velocidad de 40 MIPS (Millones de Instrucciones Por Segundo). El microprocesador trata de todas las tareas del teclado y del mostrador, gestiona los comandos y controla las señales de la estación de base, además de coordinar las demás funciones. [Teléfonos-móviles, 2006].

Lo más increíble de todo, es que hace 30 años hubiera sido necesario un edificio de varios pisos para acomodar lo que hoy sujetamos en la palma de la mano.

Un teléfono celular ha impactado significativamente la sociedad, las aplicaciones de diversa índole surgen en un mercado que demanda continuamente nuevas prestaciones.

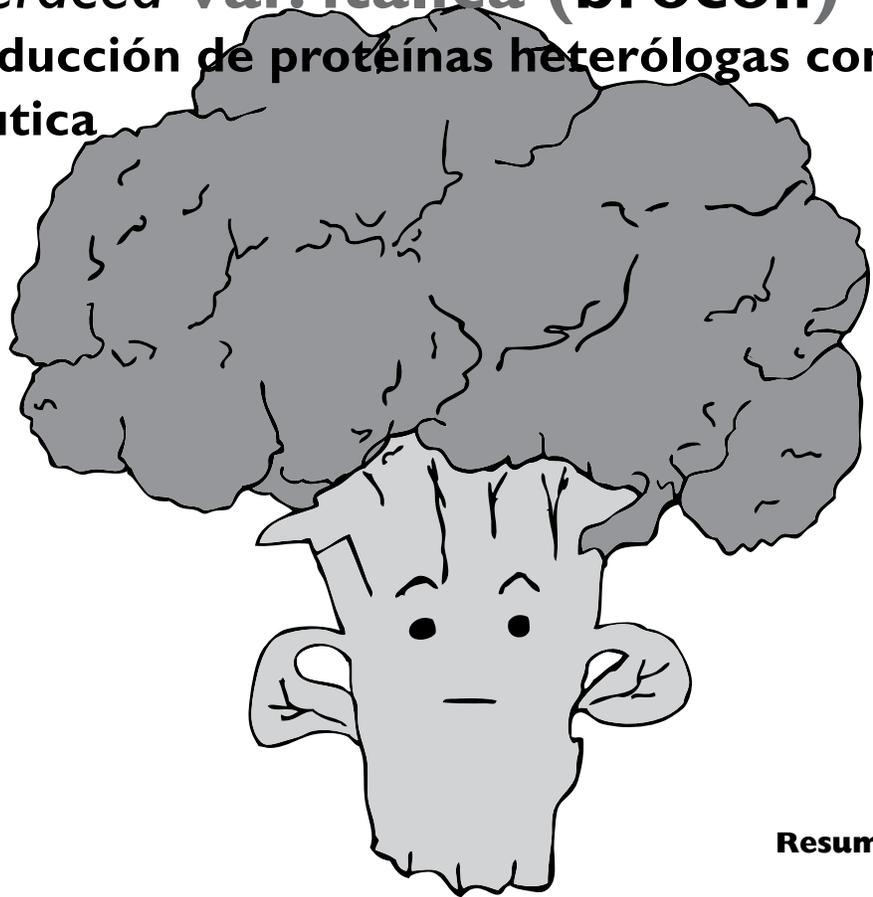
Sin embargo, el desarrollo de software para dichos aparatos se enfrenta a las limitaciones físicas de estos dispositivos.

Las características físicas que dificultan la generación de software son:

- Memoria en exceso limitada.
- Velocidad de procesamiento pequeña.
- Interfaz de entrada y salida incómodos (teclados con teclas pequeñas e insuficientes, pantallas con poca resolución).
- Dependencia de baterías.
- Comunicaciones a Internet con tarifas elevadas que incrementan el costo de la transmisión de datos.

Inducción de **raíces** transformadas de *brassica oleracea* var. *italica* (**brócoli**) útiles para la producción de proteínas heterólogas con actividad terapéutica

Edgar García López *
Emma G Ramos Ramírez *
Armando Ariza Castolo **
Josefina Pérez Vargas ***
Octavio Gómez Guzmán *
Graciano Calva Calva *



Resumen

En este trabajo se establecieron cultivos de raíces transgénicas de brócoli útiles para la transfección de genes foráneos vía *Agrobacterium rhizogenes*. Se encontró que el 95% de plántulas de brócoli infectadas con *Agrobacterium* desarrollaron raíces aéreas en los puntos de punción, mostrando las características morfológicas y microscópicas típicas de las raíces transformadas. Los cultivos de raíces transformadas presentaron una velocidad de crecimiento de 1.14 cm/d y un incremento en peso seco de 12.4 g/l. Por otro lado, los cultivos de raíces no transformadas tuvieron un consumo de sacarosa de aproximadamente 60% y un aumento en el peso seco de 5.8 g por litro, después de 30 días, además de una velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) de 0.17 d⁻¹, con un tiempo de duplicación (Td) de 5.9 d.

Acerca de los autores...

*Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.
** Departamento de Química, CINVESTAV-IPN.
*** Posgrado en Ingeniería Bioquímica, TESE.

Las técnicas de cultivo de células, tejidos y órganos vegetales, ofrecen un gran potencial para la producción de proteínas heterólogas con actividades terapéuticas y de diagnóstico (Twyman 2003). De esas técnicas, las raíces transformadas o “hairy roots” han demostrado ser un modelo biotecnológico adecuado para la expresión de proteínas, como la hormona de crecimiento e insulina humanas, u otras de origen microbiano con potencial actividad biológica (Danielle, 2001). Estas raíces transgénicas se obtienen por transfección de genes foráneos vía *Agrobacterium rhizogenes* usando vectores diseñados para trasladar y expresar el material genético foráneo en el genoma de las células infectadas con la bacteria (Tzfira, 2006).

Se encontró que el 95% de las plántulas infectas con *Agrobacterium* desarrollaron raíces aéreas en los puntos de punción, mostrando las características morfológicas y microscópicas típicas de las raíces transformadas. Los cultivos de raíces transformadas mostraron una velocidad de crecimiento de 1.14 cm/d y un aumento en peso seco de 12.4 g/l. Por otro lado, los cultivos de raíces no transformadas presentaron un consumo de sacarosa de aproximadamente 60% y un incremento en el peso seco de 5.8 g por litro después de 30 días; además de una velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) de 0.17 d^{-1} , con un tiempo de duplicación (Td) de 5.9 d.

Materiales y métodos

Transformación de *E. coli* y *A. rhizogenes*

La transformación de *E. coli* DH5 α y *A. rhizogenes* LBA9402 se realizó usando el mismo protocolo. Se prepararon células electrocompetentes y se transformaron por electroporación a 2.5 kV, 5 ms, y 200 Ω , en presencia de los vectores correspondientes, según el propósito del experimento en turno. Las células electroporadas se incubaron en 1 ml de medio LB sin antibiótico por tres horas antes de ser plaqueadas en cajas Petri con medio de cultivo LB adicionado con el antibiótico de selección: ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) para las transformadas con pBS y estreptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) para las transformadas con pCambia 1105.1 (pC1105.1).

La introducción de los vectores “a” se hizo con las mismas condiciones que para las células de *E. coli* DH5 α .

Material vegetal

Germinación. Semillas de brócoli fueron embebidas por 20 minutos en agua destilada estéril. Se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en alcohol etílico al 70% por 30 segundos. Se lavaron tres veces más con agua destilada estéril y se sumergieron en hipoclorito de sodio al 5-7% (Cloralex^{MR}) por 15 minutos, con agitación periódica. Por último, se lavaron tres veces más con agua destilada estéril y se recolectaron en una caja Petri estéril para su siembra en cámaras de cultivo de 125 ml, con 30 ml de medio de cultivo B5. Los frascos se mantuvieron en un cuarto de incubación con temperatura controlada entre 25 y 27 °C e iluminación continua a 5400 lux. Las plántulas de una semana de edad fueron utilizadas para la inducción de raíces transformadas.

Inducción de raíces transformadas

Las raíces transformadas se indujeron mediante la infección de hipocotilos por punción, a un centímetro debajo de los cotiledones, en plántulas de brócoli de una semana de edad sin hojas verdaderas, con una aguja hipodérmica infestada con una suspensión de 48 horas de crecimiento exponencial de *A. rhizogenes* silvestre, o transformada con los vectores adecuados. Los cultivos con las plántulas infectadas fueron mantenidos a 25-27 °C, con iluminación constante de 5400 lux, por 15 días o hasta la aparición de raíces pilosas en el punto de punción. Algunas plántulas fueron punzadas con agua estéril como controles.

Establecimiento de los cultivos de raíces transformadas y no transformadas

El tejido radical de plantas no inoculadas con *Agrobacterium* fue retirado de las plántulas de aproximadamente una semana de edad y se colocaron para su propagación en matraces con medio Shenck & Hildebrandt (SH) adicionado con 30 g/l de sacarosa.

Las raíces 2-3 cm de longitud potencialmente transformadas, emergidas en los puntos de punción en plántulas infectadas con *Agrobacterium*, fueron escindidas de los tallos y colocadas en frascos con medio SH semisólido, adicionado con cefotaxima (400 µg/ml) para eliminar la bacteria. Cuando estás raíces alcanzaron 10 cm de longitud, fueron transferidas a matraces Erlenmeyer con 30 ml de medio SH líquido, adicionado con el mismo antibiótico, y que se mantuvieron en una agitadora orbital a 110 rpm y 26° C.

Construcción del vector quimérico pCAMhGHE

Se amplificó por PCR (Techne TC-312) la región correspondiente al cDNA de la hormona de crecimiento humano (HGH) con los iniciadores 5'- tggctctcatgggtaaacgacggccagt-3' y 5' - tgg-tctccgatctcaggaaca- gctatgac-3'. Éstos icontienen la región para la enzima de restricción Eco3II además de los correspondientes a BglII y NcoI. El amplificado fue digerido con Eco3II y purificado de la banda en un gel de agarosa, para su posterior ligación al vector pCAMBIA1105.1 (pC1105.1) con extremos cohesivos correspondientes a NcoI y BglII.

Resultados y discusión

Transformación de *A. rhizogenes* LBA9402 con el vector pC1105.1

Las colonias de *Agrobacterium rhizogenes* LBA9402 positivamente transformada con el vector pC1105.1, crecieron adecuadamente en presencia del estreptomycin (Figura 1A) sugiriendo la presencia del DNA plasmídico (12.1 kb), que se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (Figura 1B).

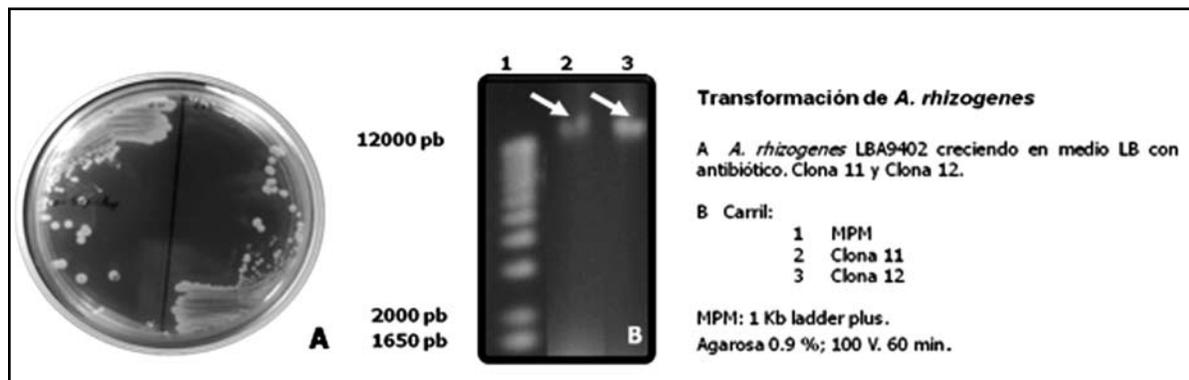


Figura 1. Colonias de *A. rhizogenes* 9402 transformadas de con el vector pC1105.1 y crecidas en presencia de estreptomycin (A) y gel de agarosa mostrando la presencia de las bandas correspondientes al vector en dos de las clonas (B).

Inducción y establecimiento de cultivos de raíces transformadas de brócoli

El 95% de las plántulas infectadas con *Agrobacterium* desarrollaron raíces aéreas y pilosas en los puntos de punción, mostrando las características morfológicas y microscópicas típicas de las raíces transformadas: ageotropismo positivo, rápido crecimiento, alta ramificación y vellosidad abundante (Figuras 2 A, B y C)

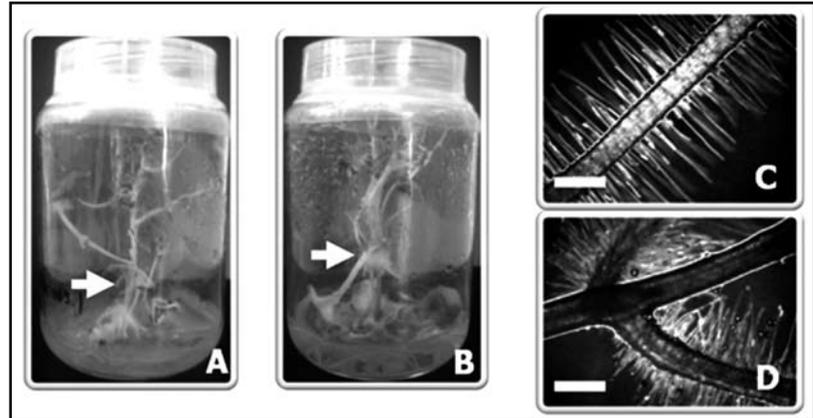


Figura 2. Inducción de raíces aéreas en plántulas de brócoli y microfotografía de raíces transformadas con *Agrobacterium* LBA9402 silvestre que contiene el vector pRi 1855 (A), y con *Agrobacterium* LBA9402 transformada con el vector pC1105.1 (B). Las microfotografías en C y D muestran raíces pilosas primarias y secundarias transformadas típicas (Barra 600 μ m).

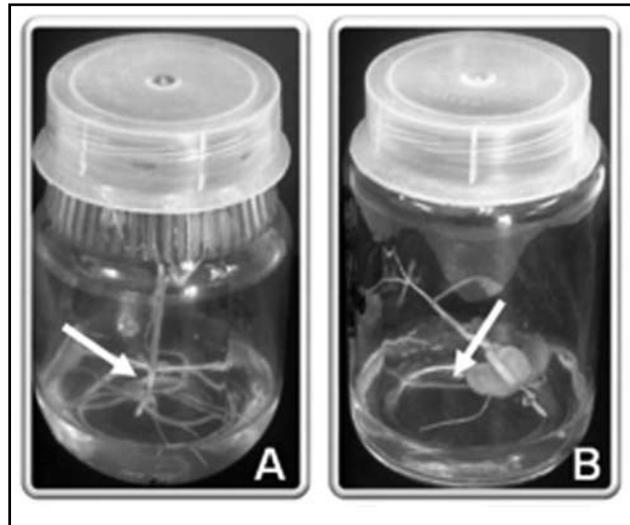


Figura 3. Elongación de raíces transformadas aéreas (flechas) en plántulas truncadas y transplantadas a medio SH. Las plántulas se infectaron con *A. rhizogenes* transformado con el plásmido pC1105.1 (A), y con *A. rhizogenes* LBA9402 silvestre llevando el plásmido pRi 1855 (B).

Con el fin de que las raíces transformadas proliferaran y tomaran el tamaño adecuado para sobrevivir separadas de la planta, ésta se retiró del medio de cultivo y la parte aérea sin raíz verdadera se transplantó a un medio semisólido de Shenck y Hildebrandt (SH), adicionado con cefotaxima (400 μ g/ml) para evitar el crecimiento de la bacteria. Todas estas plántulas truncadas transplantadas produjeron nuevas raíces sumergidas, presumiblemente sin transformar, y permitieron el adecuado desarrollo de las raíces transformadas aéreas en el punto de punción hasta 8-10 cm en sólo una semana (Figuras 3 A y B).

Una vez que las raíces alcanzaron 8 a 10 cm de longitud, fueron cortadas del resto de la planta y se sembraron en matraces con medio SH líquido, con cefotaxima (Figuras 4 A y B). Estos cultivos de raíces transformadas mostraron velocidad de crecimiento de 1.14 cm/d y un incremento de 14.3 g PS/l en 17 días.

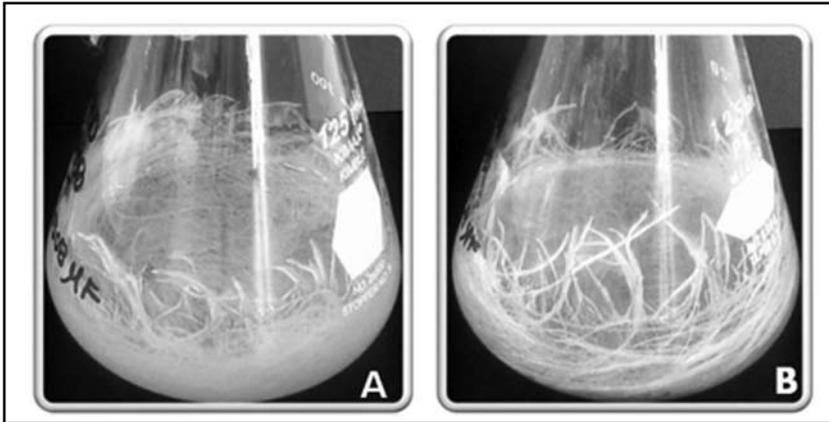


Figura 4. Raíces transformadas con *A. rhizogenes* silvestre llevando el plásmido pRi 1855 (B), y con *A. rhizogenes* transformado con el vector pCI105.1 (A).

Perfil de crecimiento de raíces no transformadas

Con propósitos de comparación, en paralelo se establecieron cultivos de raíces no transformadas utilizando explantes de tejido radical de plántulas no infectadas con *Agrobacterium*. En estos cultivos se siguió la cinética de crecimiento monitoreando la variación en el peso fresco, peso seco y consumo de sacarosa por el método del ácido dinitrosalicílico (Figura 5).

De esta manera, de acuerdo con el modelo de Monod, la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}) para los cultivos de raíces no transformadas fue de 0.17 d⁻¹, con un tiempo de duplicación (Td) de 5.9 días. Estos cultivos mostraron un consumo de sacarosa de aproximadamente 60% y un incremento en el peso seco de 5.8 g por litro después de 30 días.

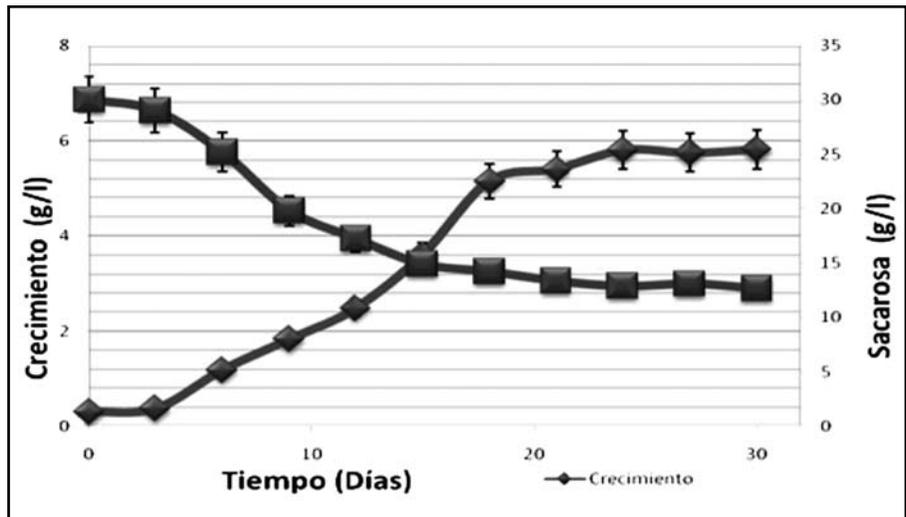


Figura 5. Perfil de crecimiento y consumo de sacarosa en cultivos de raíces no transformadas

Si bien es cierto que aún no se puede hacer una comparación entre los parámetros cinéticos de los cultivos transformados con los no transformados, se pueden confrontar los índices de crecimiento. Para los cultivos no transformados se alcanzó 5.8 g PS/l en 30 días, mientras que para los cultivos transformados se obtuvo 14.3 g PS/l en 17 días. Estos datos permiten inferir que los cultivos transformados poseen una velocidad específica de crecimiento superior a la mostrada por los cultivos normales.

Perfil de sacarosa, glucosa y fructosa en medio de cultivo

Al seguir el perfil de consumo de sacarosa en el medio de cultivo por raíces no transformadas, evaluando también glucosa y fructosa por HPLC/IR (Figura 6), se pudo observar la desaparición de sacarosa y la aparición de glucosa y fructosa desde la fase lag y durante la fase exponencial. Este cultivo, como el de la Figura 5, alcanzó la etapa estacionaria con poco más de la mitad de los azúcares consumidos, muy probablemente debido a la falta de espacio en el matraz (Figura 4). Sin embargo, la sacarosa se agota del medio de cultivo al final, pero la glucosa y fructosa mantienen una concentración residual de aproximadamente 5 g/l cada una, lo cual concuerda bien con la cantidad de sacarosa residual (12 g/l) observada en la cinética de la Figura 5.

La presencia de glucosa y fructosa no se pudo observar en la cinética mostrada en la Figura 5, debido a que el método del ácido dinitrosalicílico usado para ese estudio, evalúa azúcares totales sin distinguir entre sacarosa y sus monómeros. Esta observación resulta relevante para el presente proyecto, porque demuestra que estos cultivos son capaces de excretar proteínas estables al medio de cultivo, tal como la invertasa que hidroliza la sacarosa

en sus monómeros. Este hecho podría ser una ventaja si se piensa que esta fuente de carbono puede ser dirigida a la síntesis de proteína o material genético, favoreciendo la producción de proteínas heterólogas.

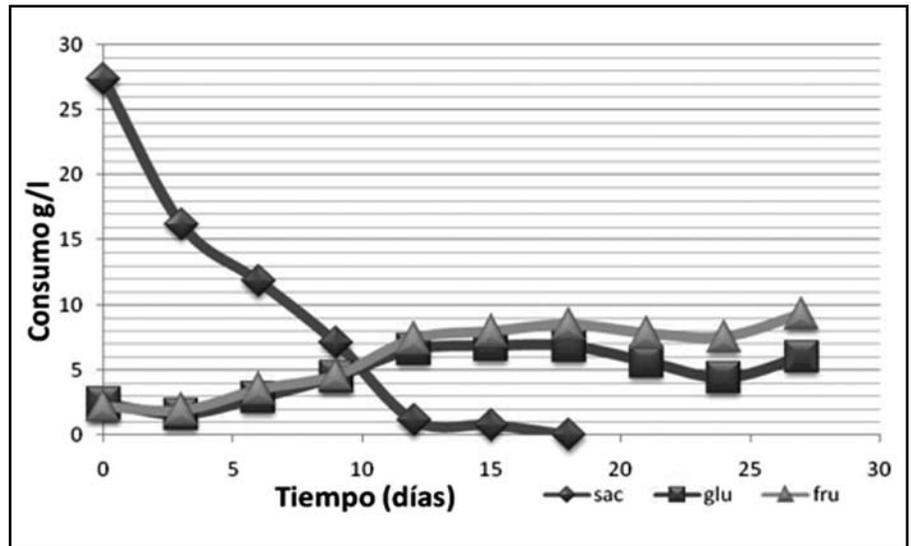


Figura 6. Perfil de sacarosa, glucosa y fructosa en medio de cultivo de los cultivos de la cinética de crecimiento de raíces no transformadas.

Construcción del vector quimérico pCAMhGHE

Amplificación del cDNA de hGHI

El cDNA de la proteína hormona de crecimiento humano de 822 pb (gentilmente donado por la Doctora Herminia G. Martínez, de la UANL) fue amplificado utilizando los iniciadores diseñados especialmente para tal secuencia y modificar los sitios de restricción flanqueantes (5'- tggctctcatgggtaaacgacggccagt-3' y 5' - tggctccgatctcaggaacagctatgac-3'). Tales iniciadores, incluyen en su secuencia un sitio de restricción separadamente a los de interés (NcoI y BglII), Eco311. Dicha estrategia fue adoptada por la cualidad de la enzima para realizar cortes en las secuencias inmediatas a la secuencia de reconocimiento en la dirección 3' (Figura 7), generando así los dos extremos cohesivos en una sola reacción de



Figura 7. Sitio de reconocimiento de Eco311

Durante la amplificación por PCR, se probó la adición del agente caotrópico Dimetilsulfóxido (DMSO, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) al 2, 3 y 5% de la mezcla de reacción. El DMSO tiene la capacidad reducir la estabilidad de las estructuras secundarias de los cebadores, favoreciendo la correcta hibridación (Figura 8). Como se puede observar en la Figura 8, la adición del agente caotrópico no mostró efecto importante sobre la amplificación, al no haber diferencias significativas entre las bandas amplificadas a distintas concentraciones de DMS.

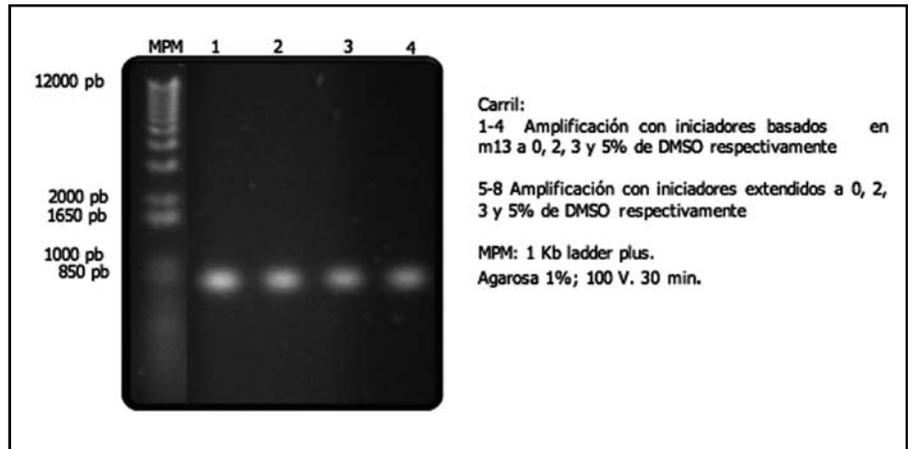


Figura 8. Amplificación del cDNA de hGH1 con los iniciadores extendidos.

Ligación del amplificado al pCI 105.1 digerido

Los productos de PCR fueron purificados de geles de agarosa, seguida de la cuantificación de su concentración, para después ser digeridos con la enzima Eco3II y generar los extremos cohesivos de NcoI y BgIII. Paralelamente, se digirió el vector pCI 105.1 con NcoI y BgIII de manera secuencial posterior a su purificación.

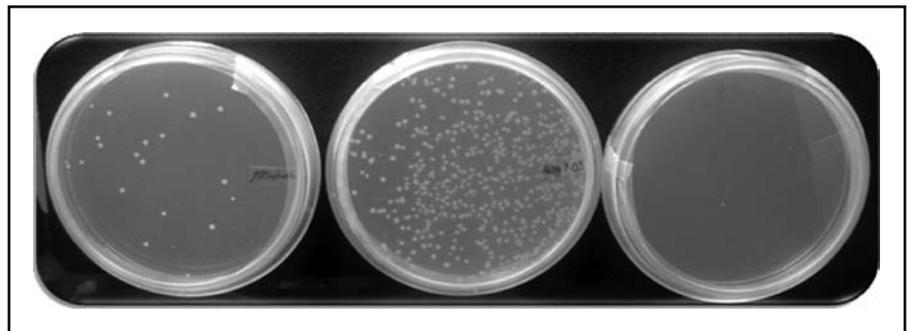


Figura 9. A) Colonias resultantes de la integración de moléculas recombinantes (pCAMhGHE); B) Control positivo de ligación; C) Control negativo de transformación.

Con los fragmentos de DNA digeridos, y en una proporción 3:1 en peso inserto – vector, se procedió a realizar la reacción de ligación probando 0.1, 0.5 y 1 Unidad de enzima ligasa (T4 DNA Ligase). Tras la ligación, se procedió a electroporar células competentes de *E. coli* DH5 α con la reacción de ligación para seleccionar clonas con las moléculas recombinantes generadas.

En los experimentos, fueron incluidos controles positivos y negativos de ligación (Figura 9). Como puede observarse, los controles positivos y negativos resultaron como se esperaba. En las placas correspondientes a las ligaciones de pCI105.1 y cDNA de hGHI (pCAMhGHE) se obtuvieron en promedio 10 colonias por placa. Tales colonias fueron sembradas individualmente en medio LB fresco con antibiótico (Estreptomicina 100 μ g/ml) y 16 de fueron usadas para extraer DNA plásmidico para un primer escrutinio, al buscar bandas en gels de agarosa, de aproximadamente 13 Kb.

Seleccionadas dos colonias, este DNA se utilizó como templado de PCR, para confirmar la presencia del inserto dentro del vector quimérico generado, utilizando los iniciadores antes citados (Figura 10). Estas colonias son las utilizadas para el establecimiento de raíces transformadas, productoras de la hormona del crecimiento humano.

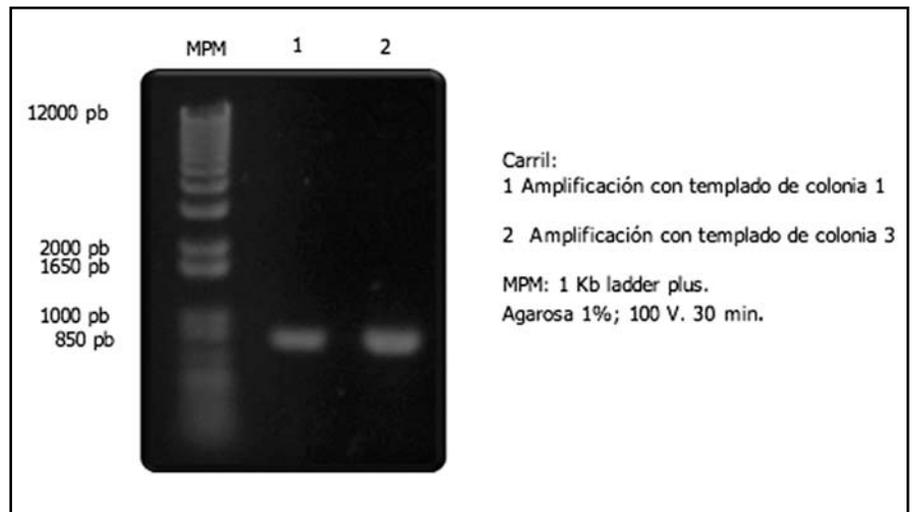


Figura 10. Amplificación del cDNA de hGHI del vector pCAMhGHE

Conclusiones

En esta parte del trabajo, se desarrollaron los protocolos para el establecimiento de cultivos de raíces de brócoli, tanto transformadas como no transformadas. Los datos para los cultivos de raíces no transformadas indican un crecimiento más bajo (IC 5.8g de PS/l), en comparación con lo observado para los de raíces transformadas (IC 12.4g de PS/l). El desarrollo acelerado de los cultivos transformados sugiere que el modelo de brócoli es un sistema prometedor para la producción de proteínas heterólogas y, según el consumo de sacarosa, quizá con bajas necesidades nutrientes.

Se construyó el vector quimérico pCAMGHE (pCAMBIA 1105.1 + el cDNA del gen I de la hormona de crecimiento humano) que será transfectado a brócoli vía *A. rhizogenes*, para probar si este modelo vegetal es adecuado para la producción de proteínas heterólogas,

Bibliografía...

- Daniell H., Stephen J., Streatfield, Wycoff K. (2001). "Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants". *Elsevier Science Ltd*. Vol. 6, 219-226.
- Twyman R., Stoger E., Schillberg S., Christou P, Fischer R. (2003). "Molecular farming in plants: host systems and expression technology". *Elsevier Science Ltd*. Vol. 21, 570-578.
- Tzfira T., Citovsky V. (2006). "Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology". *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 17. 147-154.

Caracterización del Gen LI de la Proteína Mayoritaria de la Cápside del Virus del Papiloma Humano para su Clonación en Hairy Roots de *Brassica oleracea* var *italica* (Brócoli)

Juan Manuel Jiménez Antaño *

María del Carmen Montes Horcasitas *

Emma Gloria Ramos Ramírez *

Armando Ariza Castolo **

Josefina Pérez Vargas ***

Gómez-Guzmán Octavio *

Graciano Calva Calva *

Resumen

El cáncer cervicouterino es una de las principales causas de muerte por neoplasias en países como México. La enfermedad se asocia a una infección previa por el virus del papiloma humano (VPH). Una de las principales características de este virus es la proteína LI que es la mayoritaria de la cápside y puede autoensamblarse para formar partículas semejantes a virus VLP, además de que esta proteína presenta propiedades antigénicas contra ese virus en animales. Con base en esas propiedades, se han desarrollado y comercializado vacunas a base de los VLP contra el VPH, sin embargo los sistemas de producción resultan costosos y el producto es poco accesible para personas marginadas, quienes son la población más afectada por este virus. En este trabajo se presentan los resultados sobre la caracterización del gen LI del HPV con el objetivo de establecer posteriormente un cultivo de raíces transformadas de brócoli que expresen la proteína correspondiente y la ensamblen en VLPs. También se presentan los resultados sobre el establecimiento de cultivos de raíces no transformadas de brócoli silvestre y de raíces transformadas sin el gen..



Acerca de los autores...

*Departamento de Biotecnología y Bioingeniería..

** Departamento de Química, CINVESTAV-IPN.

*** Posgrado en Ingeniería Bioquímica, TESE.

Introducción

El cáncer cervicouterino es una de las principales causas de muerte por neoplasias en países como México (Salas-U. 2006) (Diestro M. D. 2007); la enfermedad se asocia a la infección previa por VPH. Una de las principales características de este virus es la proteína LI, que es la mayoritaria de la cápside y puede autoensamblarse para formar partículas semejantes a virus VLP; además, esta proteína presenta propiedades antigénicas demostradas en animales en experimentación (Carter 2003) (Moniz. M., 2003).

Gracias a estas propiedades, se han podido desarrollar y comercializar vacunas a base de los VLP de VPH (Stanley, 2007) (McIntosh, 2008), sin embargo los sistemas en donde se expresa resultan costosos y poco accesibles para las personas marginadas, las cuales son la población más afectada por este virus. La biotecnología vegetal que se presenta en este trabajo, particularmente el cultivo de raíces transformadas, ofrece una alternativa para su producción, ya que estas raíces pueden propagarse en biorreactor o regenerarse a planta completa con potencial como vacuna comestible. El objetivo aquí es obtener un cultivo de raíces transformadas de brócoli con el gen de la proteína LI del VPH. Hasta el momento, se ha logrado aislar el gen LI mediante restricciones y PCR a partir del constructo pVAXI-LI. También se tienen cultivos control de raíces de brócoli silvestre y raíces de brócoli infectadas con *Agrobacterium rhizogenes* LBA9402.

Materiales y métodos

A partir de los plásmidos pI6LI y pHPV16 se transformaron cepas de *Escherichia coli* DH5 α para preservarlos y utilizarlos en posteriores ensayos. En este trabajo, se emplea el gen de la proteína LI incluido el constructo pI6LI, que está formado por el plásmido pVAXI y el gen LI. Para caracterizar al gen LI dentro del constructo pI6LI se realizaron digestiones con enzimas de restricción y PCR, empleando dos pares de primers: uno par amplifica el gen completo y otro que amplifica al gen sin la secuencia de localización nuclear, e inicia a partir del segundo ATG del gen LI. También se utilizaron primers universales My09 y My11, los cuales se emplearon para amplificar una región conservada de 450 pb dentro del gen LI. Se realizó la caracterización del plásmido pCAMBIA 1105.1 por medio de cortes de restricción, para que posteriormente se transforme una cepa de *A. rhizogenes* LBA 9402.

Respecto a las actividades sobre biotecnología vegetal, se establecieron los cultivos de raíces normales de brócoli usando un medio B5 semisólido para germinar semillas y obtener plántulas, a fin de iniciar el cultivo de las raíces. Así, se obtuvieron cultivos de raíces transformadas con *A. rhizogenes* que se desarrollaron en un medio SH líquido.

Caracterización del gen LI a partir del constructo p16LI mediante enzimas de restricción

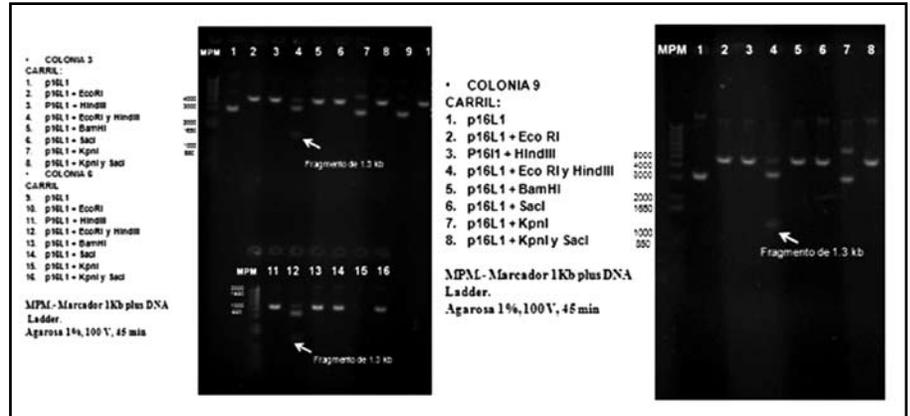


Figura 1. Electroforesis de las reacciones de restricción plasmídica de constructo p16LI para la caracterización del gen LI.

Se aislaron 24 clonas transformadas de *E.coli* p16LI y a 10 de ellas se les extrajo de DNA plasmídico; de estas extracciones, se emplearon tres para realizar la caracterización del gen LI por ensayos con enzimas de restricciones (Figura 1). De acuerdo con el tamaño que mostraron las bandas, en los gels se observó la presencia del LI en la restricción, empleando simultáneamente las enzimas EcoRI y HindIII. La enzima HindIII corta en el extremo 5', que flanquea al gen, mientras que EcoRI corta dentro del gen en la posición 1261. Se puede observar la reproducibilidad en los resultados, resaltando el fragmento correspondiente al gen LI en las restricciones adecuadas que se indican con las flechas.

En otro estudio, se efectuó la restricción con enzimas que cortan dentro del gen LI (Figura 2). Como se observa, se obtuvieron las bandas con los fragmentos esperados (flechas). Con estos resultados, se comprobó que se trata del gen LI, porque los patrones de bandas corresponden a las restricciones de las enzimas que cortan dentro del gen y en el flanco 5' con HindIII.

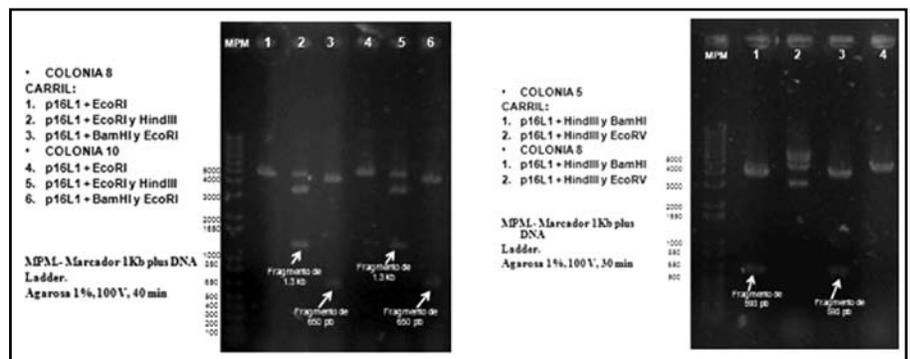


Figura 2. Electroforesis de la restricción plasmídica de p16LI con enzimas de restricción que cortan en el interior de la secuencia del gen LI.

Tabla 1. Primers diseñados para la amplificación del gen LI con y sin la señal de localización nuclear.

OD1LI	TTGACCATGGATGCAGGTGACTTTTATTTAC
OR1LI	GGTAAGATCTTTACAGCTTACGTTTTTTGCG
OD2LIATG2	TTGACCATGGATGTCTCTTTGGCTGCCTAGT
OR2LINLS-	GGTAAGATCTTCCTAATGTAAATTTTGTTT
My09	CGTCCMARRGGAWACTGAT
My11	GCMCAGGGWCATAAYAATG

Amplificación del gen LI a partir del constructo p16LI

Los oligos o primers (Tabla 1) se diseñaron tomando en cuenta la amplificación de todo el gen (OD1LI y OR1LI), considerando la amplificación a partir del segundo ATG y sin secuencia de localización nuclear (OD2LIATG2 y OR2LINLS-), lo cual, de acuerdo con Maclean, *J. et al.*, 2007 (Maclean, 2007), aumenta la producción de proteína y facilita la clonación en los vectores. También se utilizaron oligos universales para la amplificación de una secuencia conservada de 450 pb dentro del gen LI.

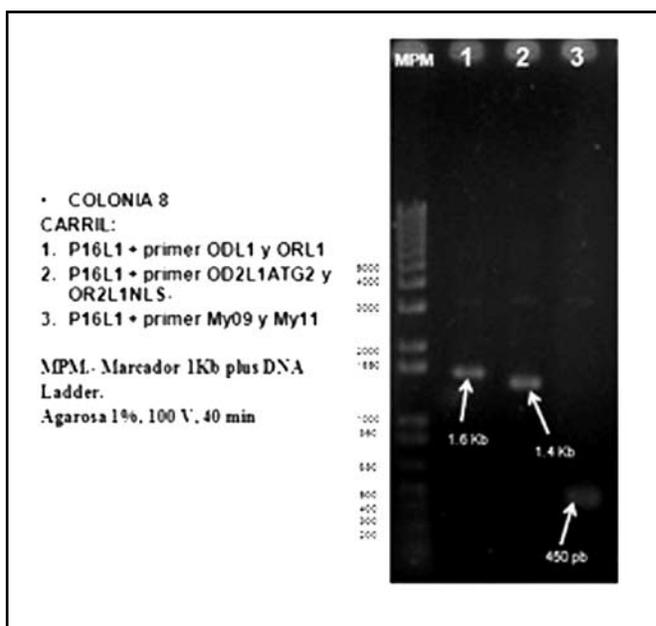


Figura 3. Productos de la PCR de p16LI usando los primers mostrados en la Tabla 1.

Como puede observarse en la Figura 3, se obtuvieron los fragmentos esperados: de 1.6 kb con los primers que amplifican todo el gen; los de 1.4 kb par amplifican el gen sin la secuencia de localización nuclear y a partir del segundo ATG, y el de 450 pb, que corresponde a la amplificación empleando los primers My09 y My11. Esto demuestra la presencia del gen LI dentro del constructo p16LI.

Caracterización del vector binario pCAMBIA 1105.1

El plásmido pCAMBIA 1105.1 se utilizó para transformar *Agrobacterium*, con el cual se infectaron plántulas de brócoli para la inducción de raíces transformadas. Este plásmido confiere resistencia bacteriana a estreptomomicina y resistencia de las raíces a higromicina; su digestión, empleando las diversas enzimas de restricción, produjo los fragmentos con los tamaños esperados (Figura 4).

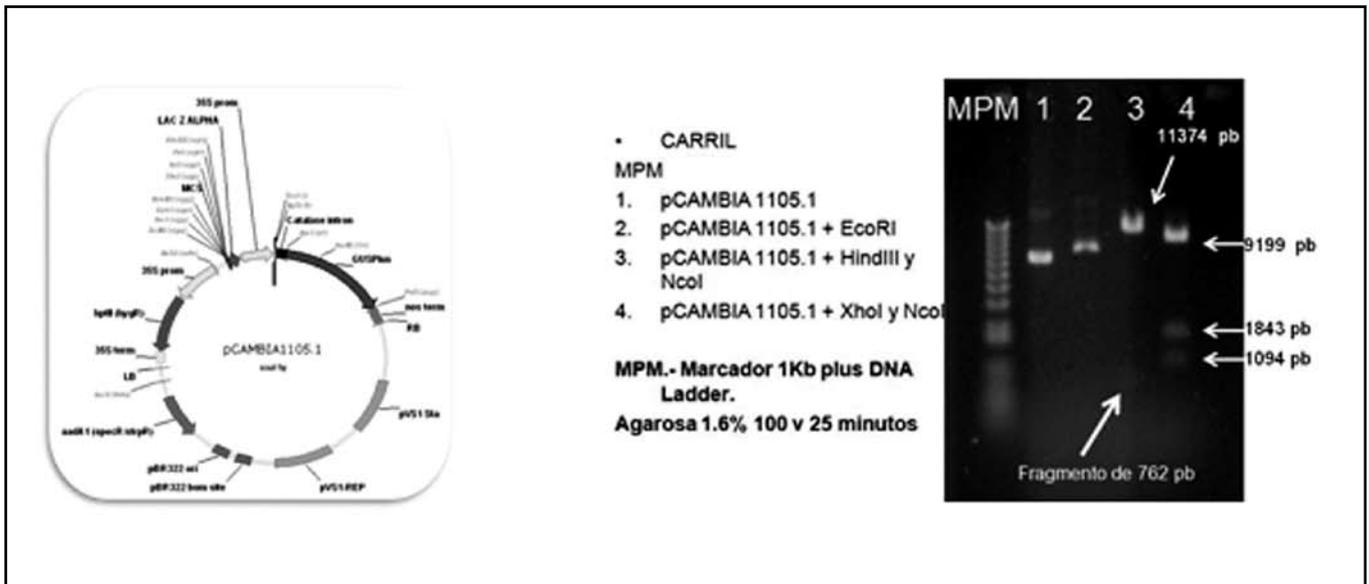


Figura 4. Electroforesis de la restricción plasmídica de pCAMBIA 1105.1 (A) con diversas enzimas de restricción (B).

Establecimiento de cultivos de raíces de brócoli

Se establecieron cultivos de raíces no transformadas y de raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* LBA9402 (Figura 5). Se resalta el sitio de infección para la agrotransformación y se indica la raíz aérea emergente, la cual se transfiere posteriormente a medio con cefotaxima para eliminar a *A. rhizogenes* y poder constituir el cultivo aséptico de raíces de brócoli transformadas. El protocolo fue previamente determinado por el grupo de trabajo del Laboratorio de Ingeniería Metabólica del CINVESTAV y fue reportado por Edgar García López *et al.*, en un trabajo presentado en este congreso.

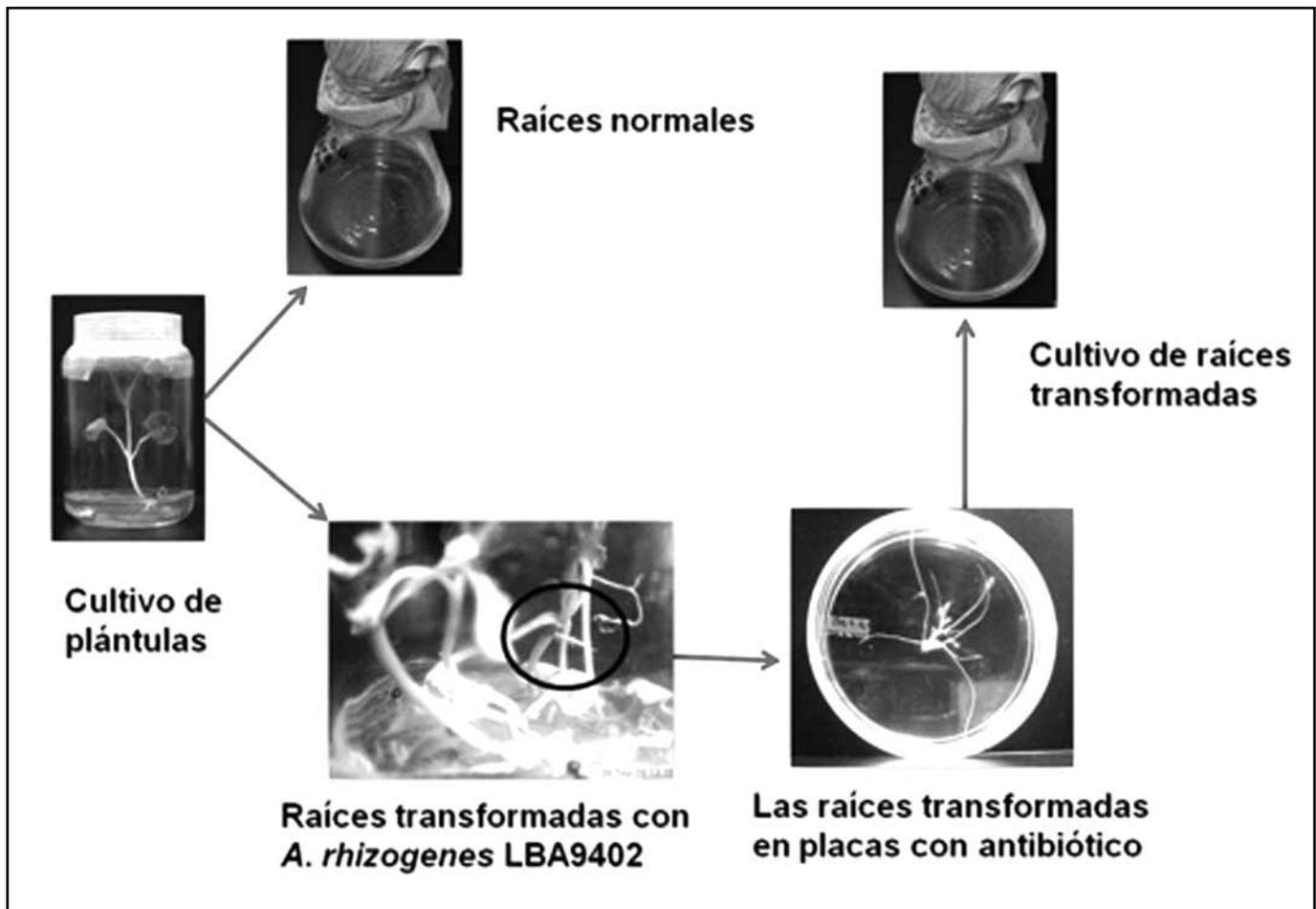


Figura 5. Esquema para del protocolo para el establecimiento de cultivos de raíces de Brócoli.

Conclusiones

Los primers diseñados hibridan y amplifican al gen LI en sus sitios correspondientes, obteniéndose como producto de PCR los fragmentos esperados de 1.6 kb, 1.4 kb y 450 pb. También se logró establecer cultivos de raíces normales y de raíces transformadas de brócoli con *A. rhizogenes* LBA9402, las cuales presentaban las características esperadas: raíces pilosas de alta vellosidad y que muestran un crecimiento con ageotropismo positivo.

Bibliografía...

Carter, J., Wipf, G., Benki, S., Christensen, N. y Galloway D. (2003). "Identification of a Human Papillomavirus Type 16-Specific Epitope on the C-Terminal Arm of the Major Capsid Protein L1." *J. Virol.* **77**(21): 11625-11632.

Diestro M. D., S. M., Gómez N. F. (2007). "Cáncer de cuello uterino: Estado actual de las vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH)." *Oncología (Barc.)* **30**(2): 14-31.

McIntosh, J., Sturpe, D. y Khanna, N (2008). "Human papillomavirus vaccine and cervical cancer prevention: Practice and policy implications for pharmacists." *J Am Pharm Assoc.* **48**: e1-e17.

Moniz, M., L. M., Hung C., y Wu T. (2003). "HPV DNA VACCINES." *Frontiers in Bioscience* **8**: 55-68.

Salas-U., I., Villalobos, E.A. y Ramírez-V., B. L. (2006). "Prevalencia de Displasia y Cáncer Cervicouterino y factores asociados en el Hospital Central de Chihuahua, México." *CIMEL* **11**(1): 12-15.

Stanley, M. (2007). "Prophylactic HPV vaccines." *J. Clin. Pathol.* **60**: 961-965.