

## Revolución de sistemas biológicos como respuesta sostenible a problemáticas de la agroindustria 4.0 y alimentación

Ma. Fabiola León Galván<sup>1,2</sup>; Cristina Cordova-Acevedo<sup>1</sup>, Mitzi Guadalupe Flores-Sánchez<sup>1</sup>, Diana Karen Juárez-Pacheco<sup>1</sup>, Karina Edith. Medina-Laguna<sup>1</sup>, Angela Paulina Mendoza-Valerio<sup>1</sup>, Juan Carlos Martínez-García<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. [fabiola@ugto.mx](mailto:fabiola@ugto.mx)<sup>1</sup>

### Resumen

El crecimiento acelerado de la población y las enfermedades causadas por la mala alimentación, sobrepeso, obesidad y enfermedades asociadas que se han agravado desde que se inició la pandemia originada del Covid-19, ponen en alerta la inminente necesidad de incrementar la innovación y producción de alimentos funcionales a través de fuentes sustentables y sostenibles monitoreados a través de la agroindustria 4.0 que garanticen además la calidad e inocuidad alimentaria. En ese sentido, se propone el uso de fuentes no convencionales como a los insectos y microalgas como alternativa de alimento por su valor nutricional tanto en proteína, lípidos, prebióticos, probióticos y posbióticos. El objetivo de esta investigación es integrar sistemas biológicos de las bacterias probióticas y sus productos metabólicos que fueron aisladas del gusano de *Aegiale hesperiaris* por nuestro grupo de trabajo con las proteínas de microalgas (espirulina). Interesantemente *in silico* se ha observado buena sinergia y conservación de las propiedades funcionales entre estos elementos, por tanto, ahora se propone comprobar esa interacción a través de la innovación y desarrollo de alimentos funcionales con ingredientes de valor nutritivo sostenibles, que permitan abonar a alcanzar los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) definidos en la Agenda 2030 de la ONU.

**Palabras clave:** Probiótico, espirulina, proteínas, péptidos.

### Introducción

De acuerdo al último reporte preliminar generado por la encuesta ENSANUT (2021), la incidencia de sobrepeso, obesidad y enfermedades asociadas se ha incrementado desde que se inició la pandemia por el Covid-19, aunado a esto, los problemas en la agricultura y ganadería causados por la falta de agua, y los altos costes de fertilizantes, han hecho inminente la búsqueda de fuentes que puedan ser utilizadas para la alimentación que sean de bajo costo de producción que utilicen poca superficie (agroindustria 4.0), y que representen valor agregado para la generación de alimentos funcionales que puedan co-adyuvar a prevenir y/o disminuir la obesidad y enfermedades asociadas (Arora et al, 2016, Garofalo et al., 2019). En ese sentido, en esta investigación se busca integrar sistemas biológicos a partir bacterias probióticas previamente aisladas y caracterizadas por nuestro grupo de trabajo del gusano *Aegiale hesperiaris* y combinarlas con las proteínas de microalgas (Espirulina). Ensayos *in silico* han mostrado buena sinergia y conservación de las propiedades funcionales entre estos elementos, por tanto, ahora se propone comprobar esa interacción a través de la innovación y desarrollo de alimentos funcionales con ingredientes de valor nutritivo sostenibles, que permitan abonar a alcanzar los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) definidos en la Agenda 2030 de la ONU<sup>1</sup>.

### Metodología

#### Extracción de DNA genómico de los aislados probióticos

Para realizar la extracción de DNA genómico se inocularon colonias individuales en tubos Falcon con 5 ml de medio MRS líquido. Los tubos se incubaron a 34 °C por 24 h. Una vez crecido, el total del cultivo se centrifugó y se descartó el sobrenadante resuspendiendo el pellet bacteriano en 200 ul de buffer TE 1X pH 8.0 (Tris 10

---

<sup>1</sup> Texto texto texto

mM-EDTA 1mM), posteriormente se realizó la extracción de DNA utilizando el kit comercial PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO Laboratories Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los DNA obtenidos de cada aislado fueron visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 1%, tiñendo el gel en una solución de bromuro de etidio.

**Tabla 1.** Condiciones de reacción de PCR para la amplificación del gen 16S rRNA.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	3 min
<b>30 ciclos</b>		
Desnaturalización	94	30 s
Alineamiento	50	30 s
Extensión	72	1:10 min
Extensión final	72	10 min
Enfriamiento	4	-

### Amplificación del gen 16S rRNA de colonias bacterianas

Para la identificación de las bacterias probióticas, se realizó una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región variable V3-V4 de los genes 16S rRNA con los oligonucleótidos UBF 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGAG-3' y 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' utilizando como plantilla el DNA extraído de los aislados. Como control positivo se utilizó el DNA extraído de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se realizó una mezcla para cada muestra con un volumen final de 25  $\mu$ l: 18.5  $\mu$ l de agua, 2.5  $\mu$ l de buffer de KCl, 0.25  $\mu$ l de dNTP's, 1.5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ l de cada oligonucleótido, 1  $\mu$ l de DNA y 0.25  $\mu$ l de Taq DNA Polimerasa (Thermo Scientific); siguiendo las condiciones de reacción de la Tabla 1. Los productos de PCR se visualizaron en electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5 %, tiñendo el gel en una solución de bromuro de etidio.

### Crecimiento y análisis molecular de espirulina

El cultivo de microalga se desarrollo reactores de 5 L, con fotoperiodo de 12 horas, y se monitoreo empleando un sistema de persepción remota, que mandaba almacena los datos en archivo drive, y manda un mensaje cuando esta llega a la fase estacionaria. Para la extracción de proteína se utilizo el método TCA-C, que consistió en tomar una muestra de espirulina del cultivo en un tubo falcón, se centrifugó a 8000 rpm por 15 minutos y se retiró el sobrenadante; posteriormente se mezcló la muestra obtenida con 15 ml de acetona fría mezclada con 10% de TCA y 0.07% de  $\beta$ -Mercaptoetanol, y se sonicó por 15 minutos en hielo en intervalos de 30 de amplitud , 10 segundos activo y 10 segundo de descanso para homogenizar la muestra. Posteriormente se centrifugó a 2000 rpm por 2 minutos a 4 °C y se dejó precipitar el sobrenadante toda la noche a -20°C. al día siguiente se centrifugó el sobrenadante a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C para obtener la pastilla de proteína que se lavó 3 veces con acetona fría. Finalmente se dejo secar pastilla a temperatura ambiente hasta eliminar el exceso de acetona y almacenar a -20°C. Para cuantificación y análisis electroforético, la pastilla se resuspendió en una solución de rehidratación (UREA 8M y CHAPS 2% con 50mM de DTT), se analizó en geles desnaturizantes SDS-PAGE.

## Resultados y Discusión

### Caracterización molecular de bacterias probióticas

En la caracterización molecular de bacterias probióticas el primer paso fue analizar la calidad de DNA genómico de las bacterias. En la Figura 1, se analizaron 7 aislados bacterianos y se puede observar en gel de agarosa al 1% que el DNA es visible con tinción de Bromuro de Etidio y con Luz UV en forma de bandas

de alto peso molecular, las bandas se presentan integras, sin barrido a lo largo del carril. Y tomando como referencia la banda de 1000 pb del marcador de peso molecular (carril 1) que indica una concentración aproximada al 100 mg, el DNA obtenido de cada aislado, es visualmente similar, por lo que la concentración es adecuada para ser empleada en el siguiente paso que es la caracterización por PCR, en la cual, con los oligonucleótidos y las condiciones descritas en la metodología permiten la identificación molecular de bacterias, ya que los oligonucleótidos están diseñados en una región conservada del gen 16S exclusiva de bacterias, y que a su vez esta región flanquea una región hipervariable; esta última característica es la que, una vez amplificadas y secuenciadas los amplicones, presentan las diferencias entre cada aislado bacteriano e indican su género, especie y muchos casos subespecie. Este análisis se presenta en la Figura 2. En la cual se observa un amplicón de aproximadamente 1400 pb, se observa una sola banda (amplicón) bien definido, sin embargo para cuestiones de secuenciación fue indispensable purificar los productos de PCR debido al barrido de fondo que se presenta en todos los casos.

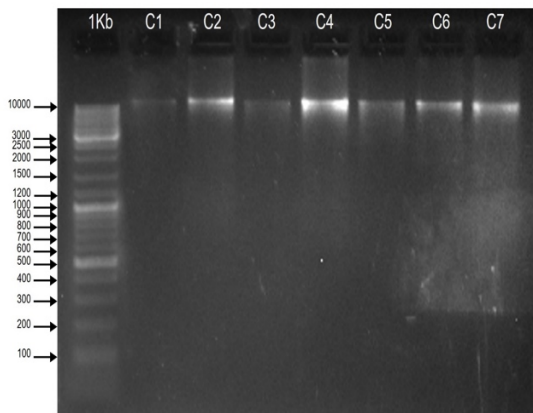


Figura 1. DNA genómico de los aislados bacterianos probióticos. Carril 1. Marcador de tamaño molecular 1KB. Carriles C1-C7. Aislados de bacterias probióticas.

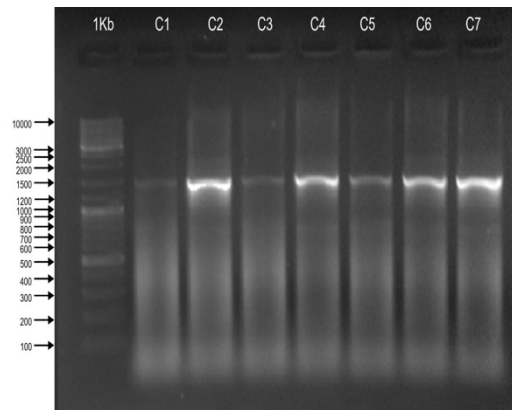


Figura 2. Amplicones del gen 16 S de los aislados bacterianos probióticos. Carril 1. Marcador de tamaño molecular 1KB. Carriles C1-C7. Aislados de bacterias probióticas.

### Análisis de proteínas de espirulina

Del cultivo de espirulina de trabajo con 5 reactores, como se muestra en la Figura 3., en la cual en el apartado 3 A es la preparación del inoculo inicial para cada reactor, en la Figura 3B se muestra el crecimiento en fase exponencial, y en la Figura 3C se muestra el sistema desarrollado 4.0 para el monitoreo del crecimiento de la microalga espirulina.

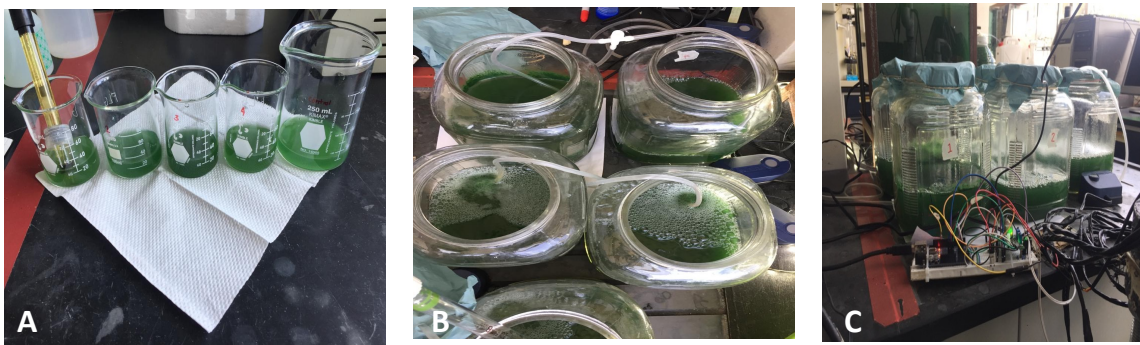


Figura 3 . Cultivo y monitoreo 4.0 de microalga espirulina.

El análisis a nivel de proteína de espirulina se presenta en la Figura 4. se muestran los pesos moleculares (kDa) identificados en el perfil electroforético, se identificaron 10 proteínas de alto y bajo peso molecular teniendo pesos (19, 25, 26, 37, 39, 55, 70, 79, 120, 125 kDa).

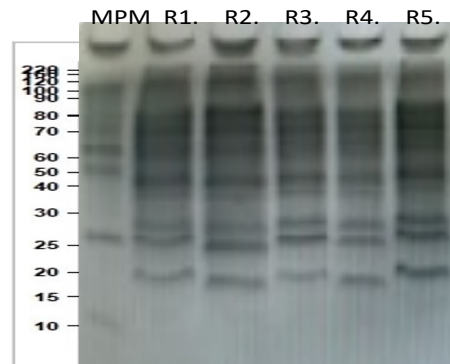


Figura 4. Análisis de proteínas microalga espirulina. Carril 1. Marcador de tamaño molecular, Carriles R1-R8,

El análisis a nivel de proteína, en terminos generales, caracterizó por su alto contenido de proteína, pueden contener de 50% a 70% de su peso seco dependiendo del punto en que se realice la determinación, encontrando que la mayor producción de proteína se da a los 13 días del cultivo, y a temperatura promedio de 27 °C. adicionalmente se puede generalizar que la proteína de microalga espirulina es de alta calidad al contener los aminoácidos esenciales, y por tanto es de particular interés en el área de alimentación humana; además de un alto contenido de ácidos grasos insaturados, polisacáridos, vitaminas, minerales y compuestos fenólicos (Lu et al., 2020). Muchos de estos compuestos, de ha descrito que tienen actividad antiinflamatoria, antioxidante, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antitumoral, estimulan el sistema inmunológico y reducen la hiperlipidemia y la obesidad, esto último ha posicionado a este tipo cianobacterias como un organismo con potencial biotecnológico bastante interesante en diversas áreas destacando salud y alimentación, que son objetivos principales del desarrollo sostenible de la ONU 2023 (Borowitzka, 2017).

## Bibliografía/Referencias

- Arora, T., & Bäckhed, F. (2016). The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives. *Journal of internal medicine*, 280(4), 339-349.
- Borowitzka, M. A., & Vonshak, A. (2017). Scaling up microalgal cultures to commercial scale. *European Journal of Phycology*, 52(4), 407-418.
- Garofalo, C., Milanović, V., Cardinali, F., Aquilanti, L., Clementi, F., & Osimani, A. (2019). Current knowledge on the microbiota of edible insects intended for human consumption: A state-of-the-art review. *Food Research International*, 125, 108527.
- Lu, Z., Loftus, S., Sha, J., Wang, W., Park, M. S., Zhang, X., ... & Hu, Q. (2020). Water reuse for sustainable microalgae cultivation: current knowledge and future directions. *Resources, Conservation and Recycling*, 161, 104975.