



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ELABORACIÓN DE UN BANCO METAGENÓMICO DEL QUESO COTIJA E
IDENTIFICACIÓN FUNCIONAL DE ESTERASAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q.A. Ingrid Torres Rodríguez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
[Facultad de Química, UNAM.](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera
[Facultad de Química, UNAM.](#)

Dra. María de los Dolores Reyes Duarte
[UAM-Cuajimalpa.](#)

MÉXICO, D. F. Marzo, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ELABORACIÓN DE UN BANCO METAGENÓMICO DEL QUESO COTIJA E
IDENTIFICACIÓN FUNCIONAL DE ESTERASAS

Jurado asignado:

Presidente: Dr. Francisco Ruiz Terán	Fac. Química, UNAM
Vocal: Dr. José Adelfo Escalante Lozada	I. Biotecnología, UNAM
Vocal: Dra. Clarita Olvera Carranza	I. Biotecnología, UNAM
Vocal: Dr. Luis David Alcaraz Peraza	I. Ecología, UNAM
Secretario: Dr. León Patricio Martínez Castilla	Fac. Química, UNAM

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología del Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch y la supervisión técnica de la Dra. Carolina Peña Montes.

Los miembros del Comité Tutor fueron:

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera	Facultad de Química, UNAM
Dra. María de los Dolores Reyes Duarte	UAM-Cuajimalpa

RECONOCIMIENTOS

A CONACYT por la beca otorgada.

A PAPIIT IN218613 por el financiamiento y la beca otorgada para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, cada vez que recorro tus pasillos y observo lo pequeño que se ve el cielo tras tu inmensidad, mi corazón se llena de orgullo por ser parte de ti. A donde vaya predicaré con los valores que me enseñaste y llevaré tu nombre muy en alto. Por mi raza hablará el espíritu.

A mi esposo Ernesto, porque gracias a tu paciencia, perseverancia, comprensión y amor hemos logrado culminar este proyecto. Porque nunca imaginamos que el camino tuviera tantos obstáculos y a pesar de todo, nunca perdiste la confianza en mí ni dejaste que me venciera. Amo vivir y ser contigo, amo la persona que eres y espero disfrutar tu compañía y tu luz por el resto de nuestras vidas. Gracias, porque sé que puedo contar contigo no hasta dos o hasta diez sino contar contigo. Te amo.

A mis padres por qué todo el esfuerzo y los sacrificios que hicieron, siguen y seguirán dando frutos. Siéntanse orgullosos, porque este logro también es suyo. Saben que los llevó en mi corazón, los amo y espero estar para ustedes así como ustedes han estado para mí todos estos años, incondicionalmente.

A mi hermano Miguel Alejandro, porque tu alegría, tu liderazgo, tu tenacidad, tu generosidad y tu optimismo me impulsan a seguirte e imitarte. Gracias por tus consejos y tus abrazos que siempre están presentes en mi vida.

A mi abuelita Agustina, por ser un motor importante en mi vida, por tu mirada, tus sonrisas, tu caminar, eres hermosa. Gracias por vivir intensamente cada momento con nosotros y amarnos tanto. Quédate con nosotros muchos años más.

A la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch por brindarme la oportunidad de superarme y por su paciencia.

A la Dra. Carolina Peña Montes por su valioso apoyo en la realización de este proyecto, por compartir sus experiencias y abrir su corazón para cobijarme en los momentos difíciles.

A Edson por seguir en mi vida, escucharme, apoyarme y aconsejarme en cualquier situación.

A Karina por ser un ejemplo de persistencia y superación, por ser una amiga incondicional e irremplazable, te quiero infinitamente.

A Cindy, Irma, Gemma, Sara, Lety, Roxana e Isaac por su amistad.

INDICE

INDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE TABLAS	V
ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	VIII
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Queso Cotija	1
1.1.1 Proceso de elaboración del queso Cotija.....	1
1.1.2 Composición química del queso Cotija.....	3
1.2 Importancia de los microorganismos lipolíticos en quesos madurados	4
1.3 Hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos.....	5
1.3.1 Lipasas y carboxilesterasas.....	6
1.3.2 Estructura de las hidrolasas de ésteres carboxílicos	7
1.3.3 Mecanismo catalítico de las hidrolasas de ésteres carboxílicos	9
1.3.4 Clasificación de las hidrolasas de ésteres carboxílicos.....	10
1.3.5 Aplicación industrial de las hidrolasas de ésteres carboxílicos	12
1.4 Metagenómica.....	13
1.4.1 Biblioteca metagenómica	14
1.4.2 Vectores de clonación	14
1.4.3 Tipos de bibliotecas	16
1.4.4 Proceso de elaboración de una biblioteca metagenómica	16
1.4.5 Métodos de análisis de la información en las bibliotecas metagenómicas.....	18
2. ANTECEDENTES	19
3. JUSTIFICACION	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivos particulares.....	24
6. MATERIALES Y METODOS	25
6.1. Diagrama experimental	25
6.2. Muestras de queso Cotija	27
6.3. Proceso para el almacenamiento de muestras de queso Cotija.....	27
6.4. Obtención del metagenoma de la microbiota del queso Cotija	28
6.5. Cuantificación de ADN y determinación de la pureza.....	28
6.6. Reacciones de PCR para evaluar la calidad del ADN metagenómico	28
6.7. Fragmentación del ADN	29
6.8. Procedimiento de corte de banda a partir de gel de agarosa.....	30
6.9. Recuperación de fragmentos de ADN en agarosa	31
6.10. Elaboración de la biblioteca metagenómica	31
6.10.1. Reacción de ligación.....	31

6.10.2.	Comprobación de la reacción de ligación	32
6.10.3.	Empaquetamiento	33
6.11.	Titulación de la biblioteca metagenómica	33
6.12.	Amplificación de la biblioteca metagenómica	34
6.13.	Búsqueda de actividades carboxilesterasa/lipasa.....	34
6.14.	Escisión del vector pBK-CMV	35
6.15.	Conservación de cepas	35
6.16.	Aislamiento del contenido intracelular y extracelular	35
6.17.	Determinación de proteína por el método de Bradford.....	36
6.18.	Evaluación cualitativa de actividad enzimática en microplaca	36
6.19.	Extracción de plásmido pBK-CMV de clonas positivas.....	36
6.20.	Diseño de cebadores para secuenciación del inserto de la clona I.....	36
6.21.	Amplificación del inserto de la clona I para secuenciación	37
6.22.	Secuenciación de insertos.....	38
6.23.	Análisis bioinformático	38
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
7.1.	Extracción de ADN metagenómico	39
7.2.	Fragmentación del ADN	41
7.3.	Purificación de fragmentos.....	44
7.4.	Elaboración de la biblioteca metagenómica	46
7.5.	Titulación de la biblioteca metagenómica	47
7.6.	Amplificación de la biblioteca metagenómica	48
7.7.	Búsqueda de actividad esterasa en la biblioteca metagenómica.....	49
7.8.	Evaluación cualitativa de la actividad enzimática en microplaca.....	51
7.9.	Secuenciación de insertos.....	52
8.	CONCLUSIONES.....	61
9.	PERSPECTIVAS	62
10.	BIBLIOGRAFIA	63
11.	ANEXOS	72
11.1.	Quesos Cotija que conformar la muestra de trabajo	72
11.2.	Recuperación del paquete celular a partir del queso sin enriquecimiento, para extracción de ADN con Kit Fast ID	72
11.3.	Recuperación del paquete celular a partir del queso sin enriquecimiento, para extracción de ADN con PCI.....	73
11.4.	Extracción de ADN utilizando el Kit Fast ID.....	74
11.5.	Extracción de ADN utilizando el método tradicional con PCI	75
11.6.	Purificación de ADN con el kit QIAquick, <i>QIAGEN</i>	76
11.7.	Marcador de tamaño molecular	77
11.8.	Purificación de fragmentos de ADN a partir del gel de agarosa mediante el kit High Pure PCR Product Purification <i>Roche</i>	78
11.9.	Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa mediante el kit Zymoclean TM Gel DNA Recovery (<i>Zymoresearch</i>).	79

11.10.	Protocolo de extracción de ADN a partir de geles de agarosa con tierra de diatomeas.....	79
11.11.	QIAEX II Agarosa Gel Extraction Protocol – <i>QIAGEN</i>	80
11.12.	Purificación y concentración de fragmentos de ADN con DNA clean & concentrator-5, <i>BIOSIS</i>	81
11.13.	Mapa del vector ZAP Express	81
11.14.	Fagémido pBK-CMV	82
11.15.	Medios de cultivo.....	83
11.16.	Soluciones.....	84
11.17.	Sustratos	84
11.18.	Cultivo de cepa <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF ⁺ para infección.	85
11.19.	Identificación de clonas CEH positivas mediante hidrólisis de α -naftil ésteres.....	85
11.20.	Protocolo de escisión del vector pBK-CMV	86
11.21.	Curva patrón de albúmina bovina sérica para cuantificación de proteína por el método de Bradford.	87
11.22.	Cálculo de la titulación de la biblioteca metagenómica del queso Cotija.	87
11.23.	Electroferograma de la secuencia del inserto de la clona I.	88
11.24.	Alineamiento entre la secuencia obtenida por Primer Walking, MacroGen y la secuencia obtenida por diseño de primer.	89
11.25.	Alineamientos pareados entre las secuencias inserto.....	91
11.26.	Cartel presentado en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Guadalajara, Jalisco, México 2015.	92

INDICE DE FIGURAS

Figura No. 1. Proceso de elaboración del Queso Cotija Región de Origen de acuerdo a las reglas de uso establecidas.....	2
Figura No. 2. Catabolismo de triglicéridos en el queso por lipólisis..	5
Figura No. 3. Reacción de hidrólisis y síntesis de triglicéridos catalizados por lipasas.....	6
Figura No. 4. Esquema de los estados fisicoquímicos de lípidos en un medio acuoso..	6
Figura No. 5. Esquema del plegamiento α/β hidrolasa.....	7
Figura No. 6. Esquema de la HPL-procolipasa que ejemplifica el cambio conformacional que sufren las lipasas que poseen “tapa peptídica” en una interfase agua-lípido.....	9
Figura No. 7. Mecanismo de reacción de lipasas.....	10
Figura No. 8. Esquema de la construcción de una biblioteca metagenómica y los métodos de análisis.....	17
Figura No. 9. Diagrama de flujo de la metodología utilizada.....	25
Figura No. 10. Esquema general de la metodología de la elaboración de la biblioteca metagenómica del queso Cotija.....	26
Figura No. 11. Procedimiento del corte de banda de agarosa que contiene los fragmentos de ADN.....	30
Figura No. 12. ADN metagenómico de la microbiota del queso Cotija extraído con el kit Fast ID <i>Genetic ID</i>	39
Figura No. 13. ADN metagenómico de la microbiota del queso Cotija extraído con PCI.....	40
Figura No. 14. Electroforesis de las condiciones de digestión de ADN metagenómico con la enzima <i>Sau3AI</i>	43
Figura No. 15. Digestiones realizadas con la enzima <i>BamHI</i>	43
Figura No. 16. Fragmentos de ADN purificados.....	46
Figura No. 17. Electroforesis del producto de amplificación de Lig-PCR.....	47
Figura No. 18. Controles de búsqueda de CEH en la biblioteca metagenómica.....	49
Figura No. 19. Búsqueda de UFP CEH positivas y confirmación.....	51
Figura No. 20. Actividad hidrolítica intra y extracelular evaluada con acetato de α -naftilo y Fast red.....	52
Figura No. 21. Alineamiento de secuencias esterasa de la familia I con el ORF F6-HBMqC-F.....	57
Figura No. 22. Alineamiento de secuencias esterasa de la familia VIII con el ORF G3-HBMqC-G.....	58

INDICE DE TABLAS

Tabla No. 1. Composición química promedio del “Queso Cotija Región De Origen”	3
Tabla No. 2. Microorganismos lipolíticos reportados en algunos quesos madurados.....	4
Tabla No. 3. Microorganismos de los cuales se han podido aislar enzimas lipolíticas..	13
Tabla No. 4. Actividades enzimáticas identificadas en bibliotecas metagenómicas de diversos ambientes.	15
Tabla No. 5. Microorganismos identificados en el queso Cotija en trabajos previos en el grupo de investigación.	20
Tabla No. 6. Componentes de la reacción de PCR para amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S.	29
Tabla No. 7. Condiciones del termociclador para la PCR para amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S.	29
Tabla No. 8. Mezcla de reacción de ligación con el vector ZAP Express.....	31
Tabla No. 9. Componentes de la reacción de Lig-PCR utilizando <i>Long PCR Enzyme Mix</i>	32
Tabla No. 10. Condiciones del termociclador para la reacción de Lig-PCR.....	32
Tabla No. 11. Cebadores utilizados para la secuenciación completa del inserto de la clona I.	37
Tabla No. 12. Componentes de la reacción de PCR para amplificar el inserto de la clona I.....	37
Tabla No. 13. Condiciones del termociclador para la PCR para amplificar el inserto de la clona I.	37
Tabla No. 14. Comparación de los datos de extracción de ADN metagenómico obtenidos por dos metodologías diferentes.....	41
Tabla No. 15. Resumen de condiciones de ensayos enzimáticos llevados a cabo con la enzima <i>Sau3AI</i>	42
Tabla No. 16. Resumen de condiciones de ensayos enzimáticos llevados a cabo con la enzima <i>BamHI</i>	43
Tabla No. 17. Condiciones finales de digestión del ADN metagenómico.	44
Tabla No. 18. Resumen de resultados obtenidos al purificar fragmentos de ADN a partir de agarosa con diferentes metodologías.	45
Tabla No. 19. Titulación de la biblioteca metagenómica generada..	48
Tabla No. 20. Bibliotecas metagenómicas construidas con diferentes vectores.	49
Tabla No. 21. Relación de clonas positivas encontradas y las clonas analizadas en una biblioteca metagenómica..	50
Tabla No. 22. Marcos abiertos de lectura predichos en las secuencias de las clonas aisladas.....	53
Tabla No. 23. Anotación de marcos de lectura abiertos (ORF) predichos en las clonas hidrolasa positivos aislados de la biblioteca metagenómica del queso Cotija.	54
Tabla No. 24. Resultados obtenidos del alineamiento de los ORF A1, A3 en la clona HBMqC-A y C4 en la clona HBMqC-C en la base de datos LED.	55

ABREVIATURAS

μM	Concentración micromolar
A	Adenina
aa	Aminoácidos
Abs	Absorbancia
ABS	Albúmina Bovina Sérica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARDRA	Análisis de restricción de ADN ribosomal
a _w	Actividad acuosa
BAL	Bacterias Acido Lácticas
BH	base húmeda
C	Citosina
c.b.p.	Cuanto baste para
CEH	Hidrolasas de esteres de ácidos carboxílicos
DGGE	Electroforesis con gradiente desnaturalizante
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP's	Desoxirribonucleósido trifosfato (Mezcla de: dATP, dCTP, dTTP y dGTP)
DO	Densidad óptica
EC	Comisión de Enzimas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ETEC	Enterotoxigénica
G	Guanina
GAR	Fosforibosilamino-glicina ligasa
Gpb	Giga de bases nucleotídicas
HBMqC	Hidrolasa de la Biblioteca Metagenómica del queso Cotija
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
IUBMB	Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular
Jalmich	Zona entre Jalisco y Michoacán
kan	Kanamicina
L	Litro
LB	Medio Luria Bertani
M	Concentración molar
Max.	Máximo
min	Minutos
Mín.	Mínimo
mL	Mililitro
mM	Concentración milimolar
NMX	Norma Mexicana
NOM	Norma Oficial Mexicana
NZY	Medio de cultivo NZ amino extracto de levadura
ORF	Marco abierto de lectura (siglas en inglés Open Reading Frame)
PAF-AH	Platelet-activating-factor acetylhidrolase

pb	Pares de bases
pBK-CMV	Plásmido para expresión de procarionte y eucarionte
PCI	Fenol Cloroformo Alcohol Isoamílico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	segundo
SAICARs	Fosforibosilimidazol-succinocarboxamida sintasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
T	Timina
TAE	Buffer Tris-acetato EDTA
TE	Buffer Tris-EDTA
UFC	Unidad Formadora de Colonia
UFP	Unidad Formadora de Placa
UV	Ultravioleta
V	Voltios

Microorganismos y cepas utilizadas

- *Escherichia coli* pETYkuU 11
- *Escherichia coli* XL1-Blue MRF'
- *Escherichia coli* XLOLR

RESUMEN

El queso Cotija es un producto lácteo tradicional mexicano que se elabora en un área ubicada entre los estados de Jalisco y Michoacán. Este alimento se elabora con leche de vaca, sin pasteurizar y se madura por un mínimo de 3 meses en la región de origen. Posee características fisicoquímicas como: alto contenido de sal, baja actividad acuosa, pH ácido, alto contenido graso y proteínico, que afectan la proliferación de diversos grupos microbianos y a su vez, permiten el crecimiento de la microbiota que confiere características distintivas al queso. Por consiguiente, la microbiota del queso Cotija ha sido objeto de estudio desde diversos enfoques y se han podido aislar e identificar bacterias ácido lácticas, levaduras, bacterias halófilas, bacterias proteolíticas y bacterias lipolíticas. Sin embargo, algunas de las técnicas empleadas se limitan únicamente a la identificación de la microbiota o al estudio de las capacidades de los microorganismos cultivables, los cuales representan sólo una pequeña fracción de la microbiota del alimento. La metagenómica funcional es una técnica que permite analizar la diversidad genética y el potencial metabólico de distintos ambientes. Por ello, en este trabajo se construyó una biblioteca metagenómica que amplió la capacidad de exploración del potencial enzimático del consorcio, incluyendo los microorganismos cultivables y no cultivables. Particularmente, se realizó la búsqueda de genes codificantes para hidrolasas de ésteres carboxílicos (CEH) mediante un escrutinio funcional.

La biblioteca construida en el vector ZAP Express consta de 136 950 clonas y almacena 0.821 Gpb del metagenoma del queso Cotija. Las características del vector utilizado, el tamaño de los fragmentos clonados y la dimensión de la biblioteca obtenida hacen viable la búsqueda de otros genes de interés.

Por otra parte, se recopilaron 13 clonas con presunta actividad CEH en la búsqueda funcional. Sin embargo, el análisis de las secuencias contenidas en las clonas supone el aislamiento de enzimas diferentes a las CEH, como: oxidoreductasas (ferredoxina, deshidrogenasa), proteínas transportadoras (hierro y glicina/betaína), proteínas involucradas en el metabolismo de purinas (GAR y SAICARs) y proteínas hipotéticas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Queso Cotija

El queso Cotija es un producto lácteo tradicional mexicano que tuvo origen en la región de Jalmich, un área ubicada entre los estados de Jalisco y Michoacán, hace más de cuatro siglos. Actualmente se elabora de manera genuina y artesanal en la misma región bajo la Marca Colectiva de “Queso Cotija Región de Origen”, la cual representa una protección oficial para los productores a falta de la Denominación de Origen. La producción del queso Cotija se limita a los meses de julio a octubre y se comercializa a partir del mes de diciembre (Álvarez B., *et al.*, 2005).

El queso Cotija es un queso que se elabora con leche de vaca entera o ligeramente descremada sin pasteurizar, que es coagulada por la adición de cuajo de origen animal. La cuajada es salada con sal de grano marina, amasada, prensada, no cocida y madurada por un mínimo de 3 meses en la región de origen. Todo esto permite la obtención de una pasta dura, seca, desmoronable, ácida, salada, de color blanco amarillento, con aroma pronunciado y de gusto fuerte (Álvarez B., *et al.*, 2005; NMX-F-735-COFOCALEC-2011).

1.1.1 Proceso de elaboración del queso Cotija

El proceso de elaboración del queso Cotija que llevan a cabo los productores de acuerdo a las reglas de uso para obtener un queso auténtico, se describe a continuación (Figura No. 1) (Álvarez B., *et al.*, 2005; García S., 2011):

Ordeña: Esta operación debe realizarse estrictamente entre las 7 y las 9 am. Su objetivo es la obtención de leche fresca que provenga de ganado criollo o cebú (de doble propósito: Pardo Suizo-Cebú, Holstein-Cebú), que se alimente por libre pastoreo dentro del área delimitada de la Sierra de Jalmich. Al finalizar la ordeña, la leche debe ser “filtrada” a través de cedazos limpios para eliminar materia extraña. La leche obtenida presenta pH 7 y una temperatura de 37-38 °C.

Reposo: La leche obtenida se deja reposar en un recipiente preferentemente de acero inoxidable durante 3 a 4 horas a temperatura ambiente (20-25 °C).

Cuajado: Para esta operación la leche debe tener pH 7 y una temperatura de 34 °C. El cuajo es adicionado a la leche en una proporción aproximada de 10 mL cuajo por cada 100 litros de leche y se mezcla rápidamente. Generalmente el tiempo de cuajado es alrededor de una hora. El cuajo utilizado debe provenir del extracto bovino del estómago de rumiantes, la marca comercial de origen animal no microbiano es Cuamex, Cuajo XXX estandarizado (enzimas coagulantes de leche bovina).

Cortado: El cuajo formado se corta con un cuchillo limpio y estéril. Esto permite verificar la consistencia de la cuajada mediante la observación de aristas bien definidas.

Reposo: La mezcla de cuajada y suero se reposa hasta que la cuajada cortada se deposita en el fondo.

Drenado: El suero es eliminado mediante decantación y colado de la cuajada en un trapo limpio y estéril. La cuajada es comprimida con ayuda del trapo para contribuir al desuerado y finalmente se deja escurrir en mesas de acero inoxidable o madera.

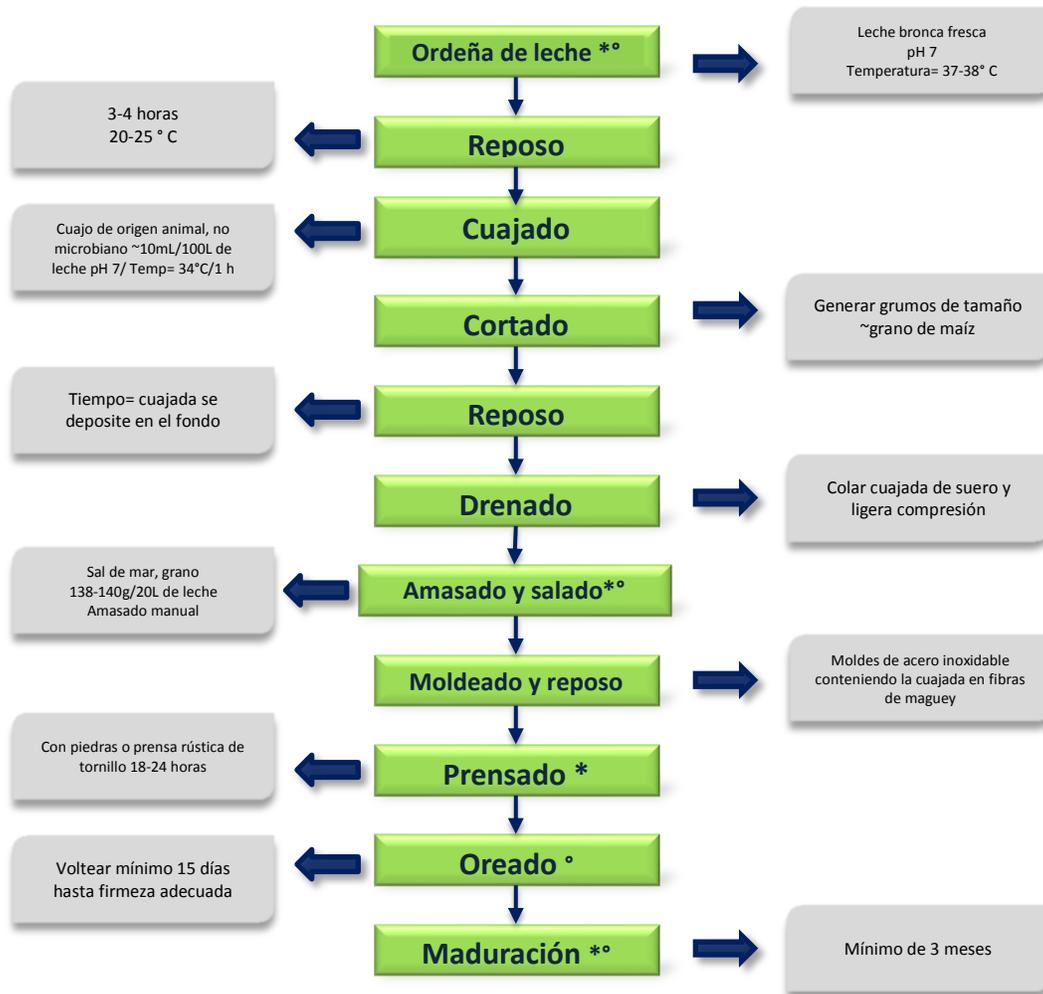


Figura No. 1. Proceso de elaboración del Queso Cotija Región de Origen de acuerdo a las reglas de uso establecidas. (*) Posibles vehículos y puntos de inoculación además de utensilios, (°) Etapas que definen los aspectos distintivos del queso Cotija.

Amasado y salado: La cuajada se amasa de forma manual en una mesa de acero inoxidable o de madera, al mismo tiempo se incorporan aproximadamente 138-140 g de sal por cada 20 litros de leche empleada (la dosificación de sal varía dependiendo de cada productor). La sal utilizada es obtenida de forma artesanal, de origen marino, en grano, libre de materia extraña y generalmente procede del estado de Colima.

Moldeado y reposo: La cuajada se deposita en dos piezas de yute o ixtle (fibra de maguey) que se encuentran en un molde de acero inoxidable. De esta forma se logra un producto cilíndrico, de 40 cm de diámetro y 18 cm de altura con un peso aproximado de 20 kg.

Prensado: La pasta se prensa de 18 a 24 horas empleando piedras de 50 a 90 kg o prensas rústicas de tornillo.

Oreado: Posteriormente, la pieza recién moldeada se faja con un cilindro y se voltea diariamente durante un mínimo 15 días o hasta que deja de escurrir suero para que adquiera la firmeza necesaria para ser manipulada.

Maduración: El queso es desfajado cuando adquiere la firmeza adecuada y se continúa volteando para alternar la cara expuesta al medio ambiente durante los siguientes tres meses. Durante este tiempo también es importante limpiar la superficie del queso con un lienzo limpio y suave en un lugar seco, ventilado y cerrado para evitar la presencia de insectos. Adicionalmente, se coloca una malla de tela limpia sobre las piezas de queso para evitar contaminaciones.

1.1.2 Composición química del queso Cotija

El queso Cotija, a través del proceso de maduración, adquiere características fisicoquímicas particulares. Es un alimento con pH ácido y baja actividad acuosa (a_w), la actividad acuosa es un parámetro estrechamente ligado a la disponibilidad de agua en el alimento. Posee un alto contenido de sal y un porcentaje de acidez suficiente para afectar la proliferación de diversos grupos microbianos y a su vez, permitir el crecimiento de la microbiota que confiere características distintivas al queso (Tabla No. 1) (Hernández B., 2007).

Tabla No. 1. Composición química promedio del “Queso Cotija Región De Origen”. Tomada y modificada de Hernández B., 2007. * Considerando un aporte calórico de 4 kcal/g para proteínas o carbohidratos y 9 kcal/g para lípidos.

Parámetro	Composición	
	Base Húmeda (BH)	Base seca
Agua (%)	32-40	-
Sólidos totales (%)	60-68	-
Proteína total (%)	Mín. 27	Mín. 39
Grasa butírica (%)	Mín. 24	Mín. 37
Minerales (%)	5.8-7.2	8.7-11.2
NaCl (%)	2.6-4.0	4.7-7.4
Carbohidratos (%)	0.08-0.15	0.12-0.24
Acidez (% ácido láctico)	0.20-0.32	-
pH	4.8-5.2	-
a_w	Máx. 0.90	-
kcal/100 g queso * (teórico)	Mín. 324	-

1.2 Importancia de los microorganismos lipolíticos en quesos madurados

La etapa de maduración que experimentan algunos tipos de quesos se caracteriza por múltiples cambios microbiológicos y bioquímicos causados por las enzimas de la leche, del cuajo, de los microorganismos iniciadores, microorganismos secundarios y bacterias ácido lácticas que se desarrollan a lo largo del proceso (Collins, Y., *et al.*, 2004; Rodríguez-Pinilla J., *et al.*, 2015). Estos cambios principalmente incluyen procesos fermentativos, proteolíticos y lipolíticos, que resultan en la formación de moléculas pequeñas a partir de la lactosa, proteínas y grasas. Mediante estas reacciones se modifica la textura de los quesos, se intensifica el aroma y desciende la a_w , de esta manera el producto final adquiere características sensoriales distintivas (Marilley L. y Casey M., 2004; Weimer B., 2007).

Los microorganismos lipolíticos son en parte responsables del desarrollo de sabor y olor durante la maduración del queso. En algunos tipos de queso se ha asociado la actividad lipolítica a la presencia de ciertos microorganismos (Collin Y., *et al.*, 2003 a, b) (Tabla No. 2).

Tabla No. 2 Microorganismos lipolíticos reportados en algunos quesos madurados.

Queso	Microorganismo lipolítico	Referencia
Cheddar	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Marth E., 1963 Marilley L. y Casey M., 2004
	<i>L. plantarum</i>	
	<i>L. brevis</i>	
	<i>L. helveticus</i>	
	<i>Lactococcus lactis</i>	
Emmental	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	García G., <i>et al.</i> , 2004
	<i>L. helveticus</i>	
	<i>L. lactis</i>	
	<i>L. bulgaricus</i>	
Brie	<i>Penicillium</i> sp.	Collins Y., <i>et al.</i> , 2004
	<i>P. camemberti</i>	
	<i>P. candidum</i>	
Camembert	<i>Penicillium camemberti</i>	Collins Y., <i>et al.</i> , 2004
	<i>P. candidum</i>	
Gruyere	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	Marth E., 1963
Cotija	<i>Yarrowia lipolytica</i>	García S., 2006 García S., 2011 Robles C., 2014
	<i>Enterococcus faecalis</i>	
	<i>Enterococcus faecium</i>	
	<i>Psychrobacter</i> sp.	
	<i>Lactococcus lactis</i>	
	<i>Bacillus pumilus</i>	
	<i>Paenibacillus</i> sp.	
	<i>Candida zeylanoides</i>	
<i>Staphylococcus</i> sp.		
Azul	<i>Penicillium roqueforti</i>	Collins Y., <i>et al.</i> , 2004
	<i>Penicillium camemberti</i>	
	<i>Geotrichum candidum</i>	
Roquefort	<i>Penicillium roqueforti</i>	Collins Y., <i>et al.</i> , 2004

Estos microorganismos poseen enzimas que hidrolizan los triglicéridos de la leche de manera gradual y generan ácidos grasos de cadena corta, que a su vez son metabolizados mediante β -oxidación y descarboxilación para producir compuestos aromáticos y de sabor como las metilcetonas y alcoholes secundarios. Si los ácidos grasos liberados de los triglicéridos reaccionan con algún grupo alcohol se formarían compuestos como el butanoato de etilo, hexanoato de etilo, acetato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo y hexanoato de metilo. Los ácidos grasos hidroxilados también pueden ser esterificados para formar lactonas. Por otra parte, los ácidos grasos poliinsaturados forman aldehídos insaturados que son saborizantes muy fuertes (Marilley L. y Casey M., 2004) (Figura No. 2).

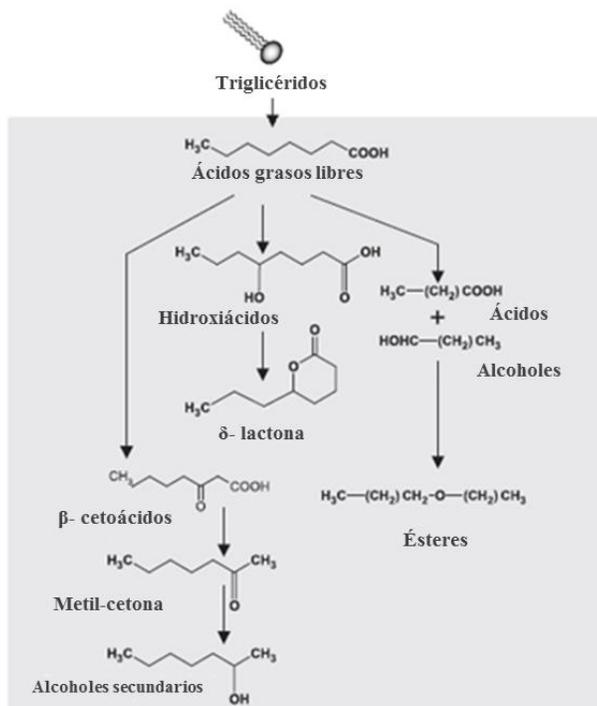


Figura No. 2. Catabolismo de triglicéridos en el queso por lipólisis. La superficie gris indica compuestos que contribuyen con el sabor y aroma en el queso. Tomada y modificada de Marilley L. y Casey M., 2004.

1.3 Hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos

La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) (NC-IUBMB, 2015) ha clasificado a las enzimas en 6 familias según sus características catalíticas. La familia EC 3 (EC-Enzyme Commission) está conformada por enzimas hidrolíticas, las cuales catalizan la ruptura de un enlace por la adición de una molécula de agua. Las hidrolasas a su vez se dividen en 12 subgrupos dependiendo del tipo de enlace que cortan. Aquellas que actúan sobre enlaces ésteres se les clasificó como EC 3.1 y particularmente las hidrolasas que actúan sobre enlaces ésteres carboxílicos (CEH) se les clasificó como EC 3.1.1. Dentro de este conjunto de enzimas encontramos a las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) y las triacilglicerol lipasas (EC 3.1.1.3). Las CEH son en términos generales un grupo de biocatalizadores de la reacción de hidrólisis de enlaces tipo éster presentes en compuestos de distinta naturaleza (NC-IUBMB, 2015).

1.3.1 Lipasas y carboxilesterasas

Las triacilglicerol éster hidrolasas también conocidas como lipasas (E.C. 3. 1. 1. 3) son enzimas que catalizan la reacción de hidrólisis de ésteres formados por glicerol (glicerol, monoglicéridos y diglicéridos) y ácidos grasos de cadena larga ($\geq C_{10}$) en una interfase agua-lípido (Figura No. 3). Las lipasas son altamente específicas en catálisis quimio-, regio- y enantioselectiva además no requieren cofactores. Adicionalmente, pueden llevar a cabo las reacciones de esterificación, interesterificación, acidólisis, alcoholólisis y aminólisis. Adicionalmente, se han realizado numerosos estudios mediante técnicas de ingeniería genética o evolución dirigida para incrementar su poder catalítico. (Reyes-Duarte D., *et al.*, 2005; Joseph B., *et al.*, 2008; Hasan F., *et al.*, 2009).

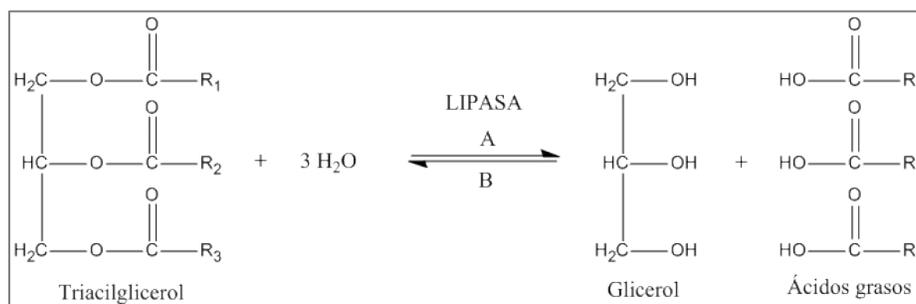


Figura No. 3. Reacción de hidrólisis y síntesis de triglicéridos catalizados por lipasas. A) Reacción de hidrólisis total de triglicéridos. B) Reacción de síntesis de ésteres. Donde R_1 , R_2 y R_3 representan las cadenas alifáticas de los ácidos grasos. Si R_1 , R_2 y $R_3 \geq C_{10}$ la enzima se denomina lipasa. Si R_1 , R_2 y $R_3 \leq C_8$ la enzima se denomina carboxilesterasa.

Por otra parte, una emulsión es un sistema de dos fases que consta de dos líquidos parcialmente miscibles, uno de los cuales se dispersa en forma de glóbulos en el otro (Jaeger K-E., *et al.*, 1999; Kim Y., *et al.*, 2006). Las reacciones lipolíticas se llevan a cabo en una interfase agua-lípido que aparece cuando se excede la solubilidad del sustrato, en este caso, triglicéridos con cadenas de longitud superior a diez átomos de carbono que se dispersan en un medio acuoso, encontrándose en un equilibrio entre los estados monoméricos, micelar y emulsión (Figura No. 4). Diversos autores reportaron que la actividad de las lipasas en una interfase agua-lípido se ve aumentada en comparación con soluciones de ácidos grasos en estado monomérico, a este fenómeno se le denominó “*activación interfacial*” (Verger R., 1997; Jaeger K-E., *et al.*, 1999; Kim Y., *et al.*, 2006).

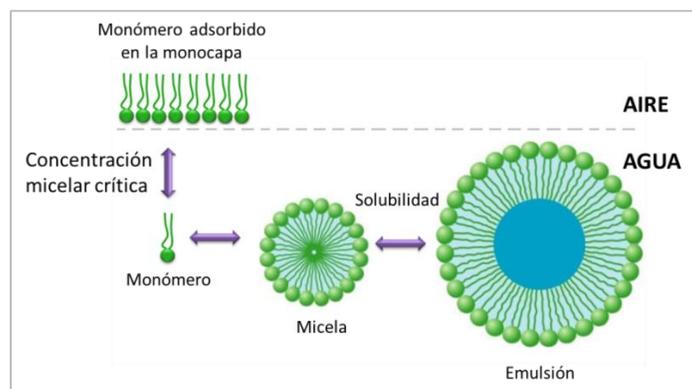


Figura No. 4. Esquema de los estados fisicoquímicos de lípidos en un medio acuoso. Imagen tomada y modificada de Verger R., 1997.

Las carboxilesterasas son otro tipo de enzimas capaces de hidrolizar enlaces tipo éster carboxílicos formados por ácidos grasos de cadena corta ($\leq C_8$) parcialmente solubles en agua. Por tanto, el criterio de clasificación entre estas enzimas y las lipasas “verdaderas” se basa en la longitud de la cadena de los ácidos carboxílicos que toman como sustrato (EC 3.1.1.3) (Arpigny J. y Jaeger K-E., 1999; Jaeger K-E., *et al.*, 1999).

1.3.2 Estructura de las hidrolasas de ésteres carboxílicos

Las lipasas, acetilcolinesterasas, tioesterasas y serino-carboxipeptidasas pertenecen a una familia de enzimas que están relacionadas estructuralmente por tener un patrón de plegamiento tipo α/β hidrolasa y cuya actividad enzimática se basa en catalizar reacciones de hidrólisis de diversos sustratos (Arpigny J. y Jaeger K-E., 1999; Jaeger K-E., *et al.*, 1999; Elend C., *et al.*, 2006).

El plegamiento α/β hidrolasa fue elucidado mediante cristalografía de rayos X a principios de los años 90's y consiste en una lámina β central formada por ocho hojas paralelas ($\beta 1$ - $\beta 8$) a excepción de la segunda hebra ($\beta 2$) que se encuentra antiparalela a las demás (Figura No. 5). La lámina β central se curva adoptando una estructura de medio barril y presenta un torcimiento que orienta las hojas $\beta 1$ y $\beta 8$ en un ángulo de 90° . El conjunto de láminas β se encuentra rodeado por seis hélices α (αA - αF). Las hojas paralelas $\beta 3$ a $\beta 8$ están unidas por α -hélices localizadas de un lado de la lámina β central, mientras que las hélices αA y αF se encuentran del lado opuesto. La curvatura de la hoja β central y la posición espacial de las hélices puede variar significativamente en diversas enzimas (Jaeger K-E., *et al.*, 1999).

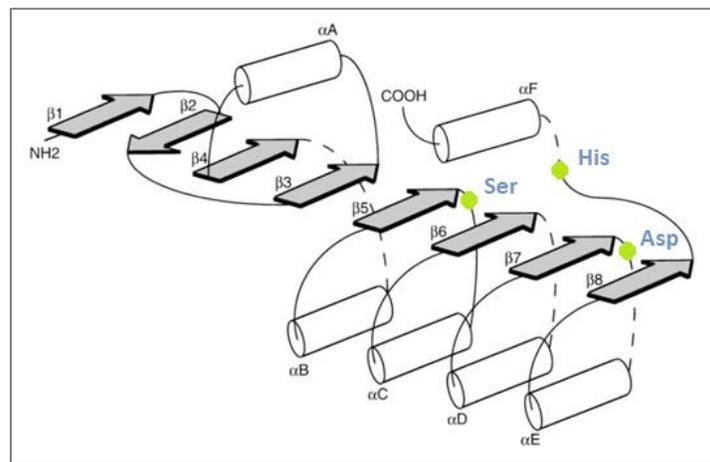


Figura No. 5. Esquema del plegamiento α/β hidrolasa. Las hebras β se representan mediante flechas numeradas de la 1- 8. Las hélices α se indican por cilindros numerados de la A- F. Los círculos simbolizan los residuos de la triada catalítica (nucleófilo-His-ácido). Tomado de Jaeger K-E., *et al.*, 1999.

El sitio catalítico está formado por una triada aminoacídica constituida por: un residuo nucleofílico que puede ser Ser, Cys o Asp, un residuo ácido que puede ser Asp o Glu y un residuo invariable de His, siempre presentes en el orden mencionado dentro de la secuencia de aminoácidos (Jaeger K-E., *et al.*, 1999; Kim Y., *et al.*, 2006). El residuo nucleofílico (Ser, Cys o Asp) está localizado en un asa

cerrada entre la hebra $\beta 5$ y la hélice αC como parte de un pentapéptido altamente conservado formado por -Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly-, donde Xaa puede ser cualquier aminoácido. La hoja $\beta 5$ junto con la secuencia donde se localiza el pentapéptido y la hélice αC forman un motivo β -giro- α llamado “codo nucleofílico” que permite el ataque eficiente del nucleófilo al sustrato (Jaeger K-E., *et al.*, 1999; Fernández T., 2005; Kim Y., *et al.*, 2006). El residuo ácido catalítico (Asp o Glu) se localiza en el asa entre la hebra $\beta 7$ y la hélice αE , mientras que la His se encuentra en el asa que conecta a la hebra $\beta 8$ y la hélice αF . Las asas en las que se posicionan los residuos que conforman la tríada catalítica son las mejor conservadas dentro del plegamiento.

Otro aspecto importante del sitio activo es la creación de una cavidad oxianiónica a causa del arreglo espacial de átomos de nitrógeno de la cadena principal que permiten estabilizar mediante puentes de hidrógeno al intermediario tetraédrico formado durante la catálisis.

La lipasa pancreática humana y la lipasa de *Rhizomucor miehei* fueron las dos primeras estructuras tridimensionales de enzimas lipolíticas que se elucidaron y en ellas se pudo apreciar un bucle o asa superficial que se denominó “tapa peptídica”. Esta “tapa” es un fragmento peptídico anfífilo que cubre el centro activo haciéndolo inaccesible al sustrato o al solvente (Verger R., 1997). La “tapa” es un subdominio que puede consistir en una o dos hélices α o un bucle, por lo que, el largo y la complejidad de esta estructura depende de cada enzima y se encuentra en el lado carboxílico de la lámina central β (Jaeger K-E., *et al.*, 1999). La presencia de este subdominio permitió explicar el fenómeno de activación interfacial que exhiben las lipasas. La tapa se abre permitiendo que los residuos catalíticos tengan acceso al sustrato cuando la enzima se encuentra en presencia de sustratos hidrofóbicos, mientras que, en ausencia de la interfase agua-lípido la tapa cubre el sitio activo (Figura No. 6).

En el período de 1990-1994 se elucidaron numerosas estructuras tridimensionales de enzimas CEH y algunos datos bioquímicos y cinéticos, con los que se concluyó que no todas las enzimas presentaban el fenómeno de activación interfacial y que la presencia de una “tapa peptídica” no se correlacionaba necesariamente con dicha activación. Por ejemplo, las lipasas de *Pseudomonas glumae*, *P. aeruginosa* y *Candida antártica* B no muestran activación interfacial pero sí poseen una “tapa peptídica” (Verger R., 1997; Fernández T., 2005). Por lo tanto, ni la activación interfacial ni la presencia de una “tapa peptídica” han sido criterios suficientes para determinar si una determinada enzima es una carboxilesterasa o es una lipasa “verdadera”. Por esta razón se ha optado por clasificar a estas enzimas con base en el sustrato que hidrolizan: las lipasas hidrolizan acilglicérols de cadena larga ($\geq C_{10}$) y las carboxilesterasas hidrolizan acilglicérols de cadena corta ($\leq C_8$) (Verger R., 1997; Jaeger K-E., *et al.*, 1999; Fernández T., 2005).

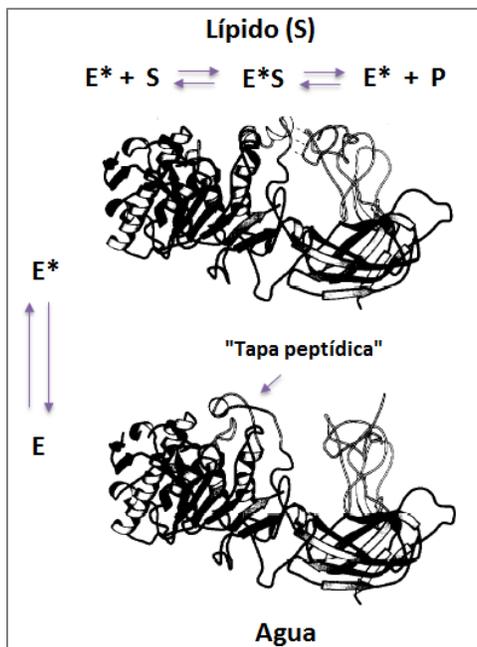


Figura No. 6. Esquema de la HPL-procolipasa que ejemplifica el cambio conformacional que sufren las lipasas que poseen "tapa peptídica" en una interfase agua-lípido. Donde E*S simboliza la conformación abierta, E representa la conformación cerrada y S- sustrato. Tomado y modificado de Verger R, 1997.

1.3.3 Mecanismo catalítico de las hidrolasas de ésteres carboxílicos

Las CEH son enzimas que actúan sobre los enlaces éster del carboxilo presente en los triacilglicérols para liberar ácidos grasos y glicerol, y su mecanismo catalítico es esencialmente el mismo. La triada catalítica nucleófilo-(Ser, Cys o Asp)-Ácido (Asp o Glu)-His es la principal responsable de la actividad de estas enzimas, como se mencionó previamente.

El mecanismo de reacción procede de manera concertada entre la enzima, el sustrato y una molécula de agua, sin embargo, se puede esquematizar en varios pasos intentando representar lo que ocurre (Figura No. 7). El sustrato se asocia a la enzima formando un complejo no covalente enzima-sustrato con al menos dos grupos NH- de cadenas laterales de aminoácidos en el sitio catalítico. La reacción se inicia con la formación de un conjunto de puentes de hidrógeno entre el COO- del Asp y el hidrógeno del NH- del imidazol y entre el N del anillo y el grupo OH- de la Ser, lo que favorece el ataque nucleofílico al carbono del carbonilo por el oxígeno del grupo OH- de la Ser catalítica, formando el primer intermediario tetraédrico. Momentáneamente el carbono del carbonilo se encuentra enlazado a 4 sustituyentes por lo que presenta una geometría tetraédrica. Posteriormente, el par electrónico del oxígeno regenera el grupo carbonilo por la formación de un doble enlace con el carbono generando un "intermediario acilo-enzima" y se libera el alcohol como primer producto de la reacción. A continuación, el par electrónico del nitrógeno del anillo imidazol secuestra un protón del agua para permitir el ataque nucleofílico al carbono del carbonilo del intermediario acilo-enzima por el átomo de oxígeno de la molécula de agua, formando un segundo intermediario tetraédrico que se resuelve de la misma forma que el anterior con la diferencia de que al regenerar el carbonilo se regenera el residuo de serina y el sustrato se libera en forma de ácido carboxílico. La

triada catalítica regenera sus grupos funcionales que a su vez mantienen interacciones tipo puentes de hidrógeno y está lista para iniciar otro ciclo de catálisis (Jaeger K-E., *et al.*, 1999).

Los intermediarios tetraédricos poseen un átomo de oxígeno cargado negativamente lo que forma una estructura tipo oxianión que es estabilizada nuevamente por los grupos NH- de las cadenas laterales de los aminoácidos presentes en una zona del sitio catalítico denominada cavidad oxianiónica (Jaeger K-E., *et al.*, 1999).

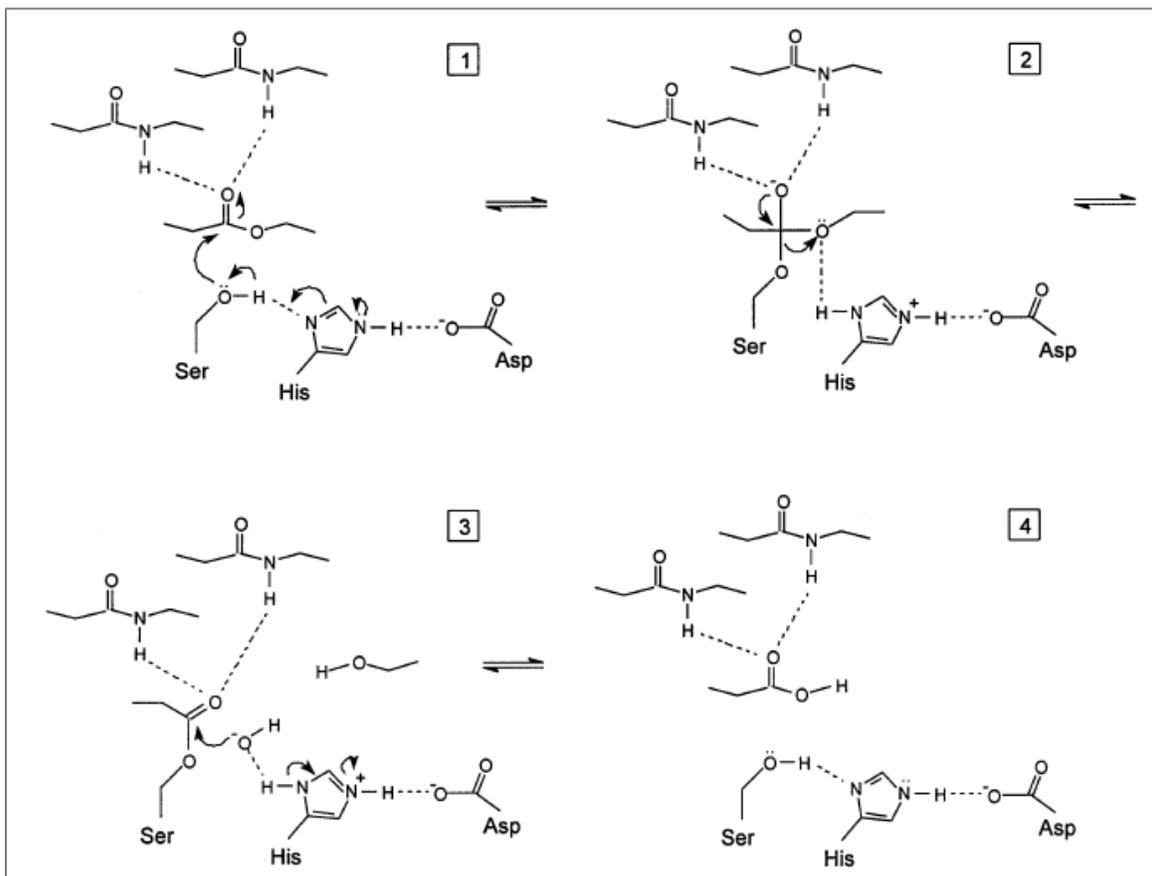


Figura No. 7. Mecanismo de reacción de lipasas. 1) Asociación del sustrato con enzima, inicio de la reacción con un ataque nucleofílico al carbono del carbonilo por el oxígeno del grupo OH⁻ de la Ser catalítica. 2) Se forma el primer intermediario tetraédrico, regeneración del grupo carbonilo 3) Se genera un "intermediario acilo-enzima" y se libera una molécula de alcohol. El par electrónico del nitrógeno del anillo imidazol propicia un ataque nucleofílico al carbono del carbonilo del intermediario acilo-enzima por el átomo de oxígeno de la molécula de agua, se genera un segundo intermediario tetraédrico. 4) Cuando se resuelve el intermediario se regenera el residuo de Ser y el sustrato se libera en forma de ácido carboxílico. Tomada y modificada de Jaeger K-E., *et al.*, 1999.

1.3.4 Clasificación de las hidrolasas de ésteres carboxílicos

Arpigny y Jaeger propusieron la clasificación de las CEH en 1999. Inicialmente se clasificaron en 8 familias de acuerdo a los motivos proteínicos comunes en sus estructuras primarias y algunas propiedades funcionales conocidas hasta el momento. Posteriormente, la elucidación de estructuras terciaria y cuaternaria junto con la aplicación de herramientas bioinformáticas para analizar los elementos involucrados en el reconocimiento de sustrato y en la catálisis, se han ido detallando y

ampliando la clasificación (Arpigny J. y Jaeger K-E., 1999; Jaeger K-E., *et al.*, 1999; Elend C., *et al.*, 2006; Alcántara S., 2009).

- **Familia I:** Formada por enzimas consideradas como lipasas verdaderas. Esta familia se clasifica a su vez en 7 subfamilias. La enzima más representativa de esta familia es la producida por *Pseudomonas aeruginosa* y algunas más que provienen de organismos Gram-positivos. Entre otras características, generalmente sus pesos moleculares varían desde 20 kDa hasta 75 kDa, pueden contar con péptido señal o no, por lo que pueden ser secretadas por la vía tipo I o II. Las lipasas de *Bacillus* tienen en común un pentapéptido consenso –Ala-Xaa₁-Ser-Xaa₂-Gly-. Por otra parte, algunas enzimas de esta familia poseen dos residuos de cisteína para formar un puente disulfuro que les permite ser estables en condiciones extremas de temperatura.
- **Familia II (GDSL):** Las enzimas de esta familia poseen un motivo –Gly-Asp-Ser-Leu- que contiene la Ser catalítica, ubicado hacia el extremo N-terminal de la secuencia.
- **Familia III:** Engloba aquellas enzimas que presentan un plegamiento típico α/β hidrolasa y contiene una triada catalítica típica. Este tipo de enzimas muestran un 20 % de identidad con las secuencias de aminoácidos de la enzima humana Platelet-activating-factor acetylhidrolase (PAF-AH) tanto intracelular como plasmática.
- **Familia IV (HSL):** Las enzimas de esta familia fueron clasificadas debido a su significativa semejanza con la secuencia aminoacídica de la lipasa sensible a hormonas de mamíferos (HSL). Sin embargo, también presentan similitudes con organismos psicrófilos, mesófilos y termófilos. Otra característica de esta familia, es que las enzimas son relativamente activas a bajas temperaturas (menores a 15 °C).
- **Familia V:** Este tipo de enzimas posee hasta 20-25 % de similitud con enzimas bacterianas no lipolíticas con plegamiento α/β hidrolasa y triada catalítica, como: epóxido hidrolasas, dehalogenasas, haloperoxidasas. Considera enzimas que proceden de microorganismos mesófilos (*Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilus influenzae*, *Acetobacter pasteurianus*), termófilos (*Sulfolobus acidocaldarius*) y psicrófilos (*Moraxella* sp., *Psychrobacter immobilis*).
- **Familia VI:** Está formada por enzimas de bajo peso molecular, aproximadamente 23-26 kDa. La forma activa de estas enzimas es en dímeros. Las subunidades presentan un plegamiento típico de α/β hidrolasa y contiene una triada catalítica -Ser-Asp-His-. Estas carboxilesterasas hidrolizan sustratos pequeños con una amplia especificidad mientras que los triglicéridos de cadena larga no son hidrolizados. Además, generalmente se localizan en el citoplasma bacteriano. Presentan hasta un 40 % de similitud con lisofosfolipasas eucarióticas.
- **Familia VII:** Son CEH bacterianas de peso molecular relativamente alto (\approx 55 kDa). Muestran hasta 30 % de identidad con las enzimas eucarióticas acetilcolinesterasa de intestino y carboxilesterasa de hígado.
- **Familia VIII:** Estas proteínas pueden tener hasta 380 aa de longitud en su estructura primaria y muestran una alta similitud con las enzimas β -lactamasas clase C. Los aminoácidos catalíticos se encuentran formando parte de un motivo conservado –Ser-Xaa₁-Xaa₂-Leu- en el extremo N-terminal y en algunas ocasiones también se reconoce el motivo –Gly-Xaa₁-Xaa₂-Gly-.

1.3.5 Aplicación industrial de las hidrolasas de ésteres carboxílicos

Las enzimas microbianas tanto de hongos como de bacterias desarrollan un papel muy importante en procesos industriales y biotecnológicos. Después de las proteasas y las carbohidrasas, las CEH son consideradas como el tercer grupo más utilizado, basado en el volumen total de ventas (Hasan F. *et al.*, 2005). Las CEH son ejemplos de enzimas que han logrado impactar a diversos sectores de la industria por sus destacadas características: son estables en disolventes orgánicos, pueden actuar en una interfase agua-lípido, presentan especificidad por sustrato, poseen regio- y estereoespecificidad, pueden catalizar una gran variedad de reacciones, además no requieren cofactores (Arpigny J. y Jaeger K-E., 1999; Akoh C., *et al.*, 2004; Reyes-Duarte D., *et al.*, 2005). Las CEH han encontrado aplicaciones en algunas industrias como son: la industria de alimentos, fragancias, cosméticos, textil, farmacéutica, detergentes, química, agroquímica, por nombrar sólo algunos (Arpigny J. y Jaeger K-E., 1999; Jaeger K-E., *et al.*, 1999; Akoh C., *et al.*, 2004; Fernández T., 2005; Rivera-Pérez C., *et al.*, 2007).

La aplicación más importante de las CEH desde el punto de vista del tamaño del mercado, es sin duda, en la industria de los detergentes, donde son adicionadas a productos que se comercializan con la finalidad de ser utilizados en hogares y lavanderías industriales (Jaeger K-E., *et al.*, 1994; Carrera J., 2003; Hasan F., *et al.*, 2005; Rajendran A., *et al.*, 2006).

Las CEH también han pasado a ser una parte integral en la actual industria alimentaria (Uhlig H., 1998; Peña M. y Quirasco B., 2014). La mayoría de enzimas lipolíticas que se utilizan en alimentos son de origen fúngico debido a que son reconocidos como seguros (GRAS) (Tabla No. 3). En la industria alimenticia, son utilizadas para el desarrollo de determinados sabores en la elaboración de quesos madurados, vegetales fermentados y mantequilla, debido a la producción de ácidos grasos de cadena corta (C_4-C_6) que aportan un sabor fuerte y penetrante. O bien, si se generan ácidos grasos de cadena larga ($\geq C_{12}$) son metabolizados por otros microorganismos dentro del alimento para formar otros productos aromáticos como los β -cetoácidos (compuesto característico en queso) (Verger R., 1997; Akoh C., *et al.*, 2004; Fernández T., 2005). Otra aplicación importante de las CEH dentro de este campo, es la modificación de grasas y aceites en cuanto a posición, longitud y grado de insaturación de los triglicéridos que influye fuertemente tanto en las propiedades físicas como nutritivas. Por otra parte, la hidrólisis enzimática de grasas evita la degradación exhaustiva de los ácidos grasos que se presenta cuando se somete a condiciones drásticas (temperatura: 240-260 °C y presión: 60 bar) en un proceso químico convencional (Hasan F., *et al.*, 2005; Rivera-Pérez C., *et al.*, 2007). La interesterificación de grasas y aceites, produce acilglicérols modificados que no pueden obtenerse mediante química tradicional. También se puede alterar el punto de fusión de un aceite, modificando la composición y/o estructura de sus triglicéridos mediante reacciones de transesterificación, utilizando como co-sustrato determinados ácidos grasos u otros triglicéridos de diferente composición (Jaeger K-E., *et al.*, 1994; Verger R., 1997; Streit, W. y Schmitz R., 2004; Fernández T., 2005). Un ejemplo de este proceso es la utilización de la lipasa de *Rhizomucor miehei* que mediante una reacción de transesterificación, reemplaza el ácido palmítico por el ácido esteárico para proporcionar el triglicérido esteárico-oleico-esteárico con el punto de fusión adecuado para su utilización en la elaboración de chocolate (Jaeger K-E., *et al.*, 1999; Rivera-Pérez C., *et al.*, 2007).

En la industria textil las lipasas se han utilizado para el procesamiento del cuero en la eliminación de la grasa subcutánea. En la industria del papel se han utilizado para eliminación de la brea de la pulpa del papel, evitando producir un papel pegajoso y con huecos. La brea es una resina de la madera compuesta de triacilgliceroleos y ceras que causa pegajosidad en el proceso (Jaeger K-E., *et al.*, 1999). En la industria química se utilizan para la síntesis orgánica de pesticidas mediante síntesis estereoespecíficas (Jaeger K-E., *et al.*, 1999; Akoh C., *et al.*, 2004; Fernández T., 2005).

Tabla No. 3. Microorganismos de los cuales se han podido aislar enzimas lipolíticas. Tomada y modificada de Hasan F., 2005.

Microorganismos productores de lipasas		
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.
<i>B. subtilis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Botrytis cinérea</i>
<i>B. thermoleovorans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Chromobacterium viscosum</i>
<i>B. thermocatenuatus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>Streptomyces flavogriseus</i>
<i>B. coagulans</i>	<i>S. warneri</i>	<i>Trichosporon asteroides</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>S. xylosus</i>	<i>T. laibacchii</i>
<i>P. fragi</i>	<i>Penicillium cylopium</i>	<i>Rhizomucor miehei</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. simplicissimum</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Pichia urtonii</i>
<i>Candida cylindracea</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>Fusarium solani</i>

1.4 Metagenómica

El planeta tierra es en sí un ecosistema complejo que comprende una gran variedad de subsistemas con poblaciones y características tanto geográficas como fisicoquímicas muy diversas. Se ha estimado que la tierra alberga más de 1×10^{30} microorganismos y se piensa que la vida unicelular sigue representando la gran mayoría de los conductores funcionales de los ecosistemas de nuestro planeta (Whitman W.B., *et al.*, 1998; Reyes-Duarte D., *et al.*, 2007; Ekkers D. M., *et al.*, 2012). Sin embargo, el conocimiento sobre la diversidad, el potencial funcional y la interdependencia de estos organismos microscópicos siguen siendo limitados (Knight R., *et al.*, 2012).

El estudio de los efectos del medio ambiente sobre los microorganismos fue iniciado por Antoni van Leeuwenhoek, cuando comparó las observaciones al microscopio de la suciedad de entre sus dientes y después de tomar una taza de café, los “animaluchos” habían desaparecido o estaban inmóviles. Leeuwenhoek fue el primero en describir una correlación entre el cambio de temperatura y la viabilidad de los microorganismos (Ergerton F. N., 2006). Desde entonces, se han correlacionado rasgos de hábitat tales como temperatura, salinidad, pH, contenido de nutrientes, entre otros, con la distribución de especies de microorganismos en dicho hábitat (Wooley J. C., *et al.*, 2010).

La metagenómica es una disciplina que permite el estudio del conjunto de genomas de un hábitat determinado mediante la el análisis funcional y de secuenciación de la información genética de los microorganismos tanto cultivables como no cultivables para establecer identidades, funciones y

relaciones entre los individuos de una población (Chen K., *et al.*, 2005; Van Lanen S., *et al.*, 2006; Bonilla-Rosso G., *et al.*, 2008).

Los datos genómicos de diversos ambientes obtenidos a través de estudios realizados con técnicas de microbiología tradicional son altamente sesgados y no representan una imagen real de los genomas de las especies microbianas contenidas. Esto se debe principalmente a que sólo un pequeño porcentaje de los microorganismos en la naturaleza puede ser cultivado, menor al 1 % (Torsvik V., *et al.*, 2002; Wooley J. C., *et al.*, 2010). Por el contrario, los estudios metagenómicos utilizan material genético extraído directamente de todo el conjunto de microorganismos provenientes de un entorno natural, denominado metagenoma en 1988 por Handelsman y colaboradores (Handelsman J., 2004).

1.4.1 Biblioteca metagenómica

La metagenómica se apoya en bibliotecas metagenómicas para poder analizar la información genética de una población. Una biblioteca metagenómica o banco metagenómico es una colección de fragmentos de ADN clonados en un vector, que de forma representativa contienen todos los genomas microbianos presentes en un determinado hábitat (Handelsman J., 2004). Actualmente, se crean bibliotecas de diversas muestras (generalmente de ambientes) con la finalidad de estudiar toda la diversidad microbiana en busca de nuevas actividades enzimáticas aplicables a procesos sustentables en el ámbito industrial (Tabla No. 4) (Perrera J., *et al.*, 2010). La construcción de una biblioteca metagenómica debe tomar en cuenta el tamaño promedio de los fragmentos de ADN a insertar, tipos de vectores y consideraciones para la expresión de los genes de interés (Ekkers D. M., *et al.*, 2012). Las cualidades más importantes de una biblioteca metagenómica son:

- La representatividad: debe contener la mayor cantidad de especies del metagenoma.
- El tamaño: se refiere al número mínimo de clonas independientes que debe de contener para que la totalidad del ADN de partida este representado. El tamaño del banco de genes depende en gran medida de la longitud del ADN inserto promedio en los recombinantes.

1.4.2 Vectores de clonación

Para poder elaborar un banco metagenómico se requieren vectores de clonación que actúen como vehículo para transportar el ADN en estudio. Para realizar una elección adecuada del vector a utilizar debe tomarse en cuenta, las enzimas de restricción que se emplearan a lo largo del proceso, el tamaño de los fragmentos de ADN a ser insertados y el método de selección de genes de interés (Ferrer M., 2004; Perrera J., *et al.*, 2010). Los principales vectores se enuncian a continuación:

- 1) Plásmidos: Estos vectores pueden estabilizar fragmentos de ADN de 3 a 10 kpb, lo que disminuye la probabilidad de encontrar grandes genes completos.
- 2) Cósmidos/ Fósidos: Son capaces de transportar fragmentos de 45 kpb, lo que permite una mayor capacidad de clonación y a la vez una biblioteca menos numerosa, esto aumenta la probabilidad de clonar grupos de genes completos o regiones cromosómicas grandes. Sin embargo, son de difícil construcción y mantenimiento.

- 3) Cromosomas artificiales: Se utilizan los cromosomas artificiales bacterianos (BAC's) para contener fragmentos de varios cientos de kilobases aislados directamente de los microorganismos de un ecosistema particular. A pesar de proporcionar una gran información genómica, no son fáciles de construir, ni de conservar, así como tampoco de realizar búsquedas de actividades enzimáticas concretas. Dependiendo del sistema elegido, pueden ser de bajo o alto nivel de expresión de genes.
- 4) Fagos lambda: Los fagos lambda son capaces de aceptar insertos de hasta 20 kpb tanto de organismos procarióticos como eucarióticos. Las bibliotecas construidas con este tipo de vector son de fácil expresión en hospederos heterólogos.

Tabla No. 4. Actividades enzimáticas identificadas en bibliotecas metagenómicas de diversos ambientes (Tomada y modificada de Ferrer M., *et al.*, 2009).

Tipo de enzima	Fuente	Método de búsqueda
Esterasa	Sedimentos de aguas	Funcional
	Suelo del bosque, muestras de marismas y playas	
	Rumen de vaca	
	Agua potable	
	Agua de lagos	
Lipasa	Cuenca anóxica hipersalina	Funcional
	Sedimentos	
	Suelos y composta	
	Tierra de bosques	
Celulasa	Agua de estanques	Funcional
	Suelo	
	Rumen de vaca	
Fosfatasa	Agua de lagos y mares	Funcional
Fosfatasa	Suelo y composta	Funcional
β -lactamasa	Sedimentos fríos de los montes submarinos de Edison (Nueva Guinea)	PCR
Amilasa	Musgo cubierto de lodo	Funcional
β -glucanasa	Intestino de ratón	Funcional
Quitinasa	Hábitats acuáticos diversos: Mar de los Sargazos y lago alcalino hipersalino	Funcional y PCR
	Larvas de gusano (<i>Lacnobia oleracea</i>)	
Xilanasa	Intestino humano	Funcional
	Tumores de insectos (termitas y polillas)	
Pectinasa	Suelos de zonas tropicales	Funcional
Ciclodextrinasa	Rumen de vaca	Funcional
	Lodos de aguas termales	
Amidasa	Sedimentos marinos: superficie de marismas salinas	Funcional
	Tierra arcillosa y lodos marinos (con / sin enriquecimiento)	
Carboxipeptidasa	Intestino de insecto (<i>Helicoverpa armigera</i>)	PCR

1.4.3 Tipos de bibliotecas

En función de la naturaleza y tamaño del ADN a estudiar, así como, del método de selección de genes de interés existen tres tipos de bibliotecas metagenómicas (Vieites J., *et al.*, 2010):

- a) Bibliotecas de expresión: Este tipo de bibliotecas son diseñadas para explorar la variedad de capacidades metabólicas de los microorganismos de un hábitat. Sin embargo, es poco frecuente conocer la identidad de los microorganismos responsables de cierta actividad. El ADN metagenómico se fragmenta en tamaños de 3 kpb – 20 kpb, de tal manera que los genes clonados se orienten de manera apropiada y sean regulados fuertemente por las señales del vector de expresión. Los vectores de clonación contienen todas las señales necesarias para permitir la transcripción y traducción *in vivo* de los insertos en la célula hospedera, por lo que el análisis de sus clonas se puede realizar con un método basado en la detección de los productos proteínicos codificados en ellos (Perrera J., *et al.*, 2010).
- b) Bibliotecas de clonación: Son construidas como una herramienta complementaria para la secuenciación masiva de genomas o metagenomas. Los fragmentos de ADN generados son largos, la longitud oscila entre 40 kpb- 200 kpb. Los vectores de clonación utilizados son simples, es decir, no contienen señales para la expresión de los genes contenidos. Este tipo de bibliotecas pueden ser analizadas por hibridación con sondas oligonucleotídicas marcadas (marcadores filogenéticos como 16S ADN_r, rpoB, Rec A), secuenciación o PCR múltiple.
- c) Las bibliotecas de ADN_c: Son bibliotecas construidas a partir del ADN_c obtenido del RNA_m de la población. Dependiendo del vector seleccionado las bibliotecas de ADN_c pueden ser de expresión o de clonación. Cabe mencionar, que este banco de genes permiten explorar el potencial de los genomas tanto procarióticos como eucarióticos, debido a que los insertos son secuencias carentes de intrones y pueden ser expresados en sistemas procarióticos.

Cada tipo de biblioteca tiene ventajas y limitaciones, pero en conjunto, permiten integrar los resultados y comprender mejor el hábitat en estudio. El descubrimiento de una enzima en una biblioteca de expresión, seguido de la identificación del mismo gen en una biblioteca de clonación, conforma un poderoso medio para estudiar a los microorganismos de un hábitat y evaluar el potencial biotecnológico que nos ofrecen (Vieites J., *et al.*, 2010).

1.4.4 Proceso de elaboración de una biblioteca metagenómica

La elaboración de un banco metagenómico se basa en la extracción del ADN del conjunto de microorganismos de una fuente natural. Como mínimo, se requieren entre 20 y 50 µg de ADN que posteriormente son fragmentados con enzimas de restricción hasta obtener insertos de longitud adecuada a la capacidad del vector de clonación. Finalmente, se ligan los fragmentos generados con

el vector seleccionado. Una vez que la biblioteca de genes ha sido construida, el siguiente paso es someterla a métodos de análisis para detectar las clonas de interés (Figura No. 8) (Ferrer M., 2004).

La etapa de clonación, supone la incorporación de cada uno de los fragmentos a una molécula de vector. Por consiguiente, al transformar un cultivo celular, cada una de las células hospederas albergará una molécula recombinante diferente (Perrera J., *et al.*, 2010).

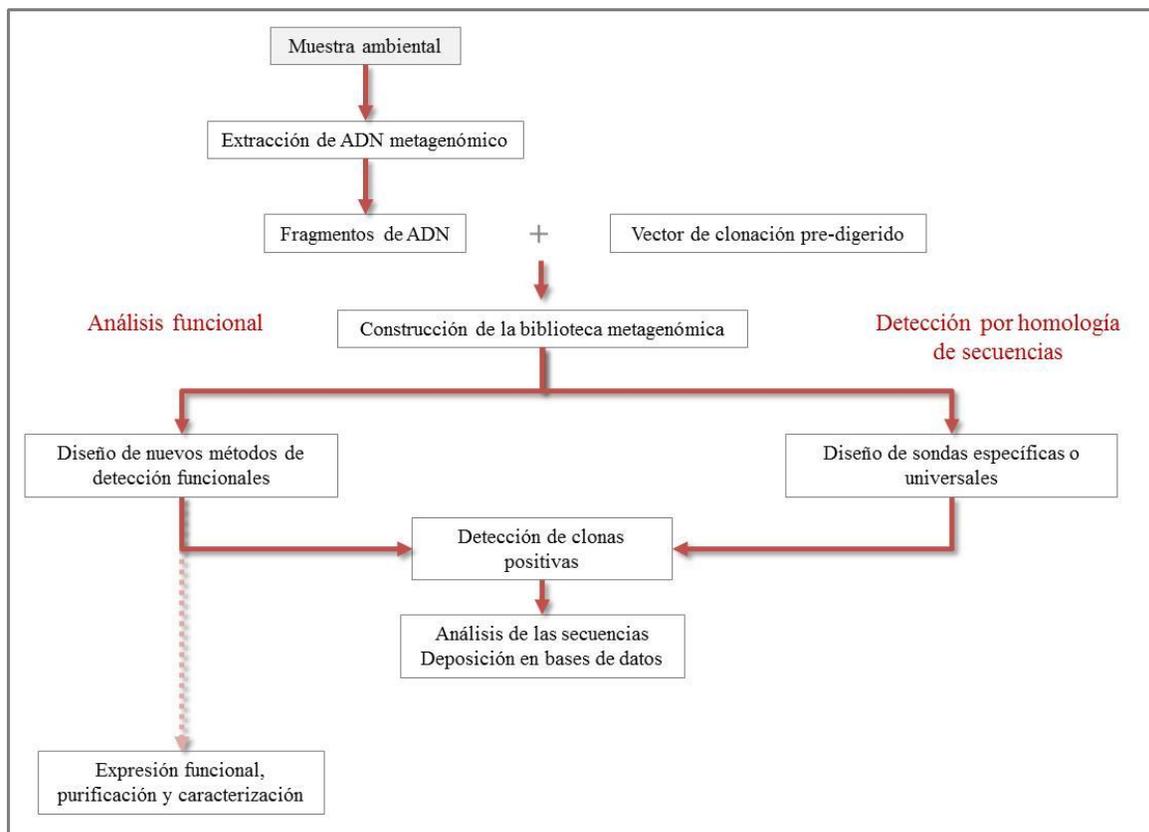


Figura No. 8. Esquema de la construcción de una biblioteca metagenómica y los métodos de análisis. (Tomada y modificada de Handelsman J., 2004; Ferrer M., *et al.*, 2009).

El proceso de elaboración de un banco metagenómico implica la superación de varios puntos críticos para tener éxito, como son: la dificultad para aislar el ADN metagenómico, la integridad del ADN obtenido, en algunos casos, la contaminación de ADN purificado con compuestos contaminantes que copurifican con el ADN, la capacidad de clonar los fragmentos de ADN suficientemente grandes en los vectores apropiados y de su capacidad para expresar la información genética en hospederos heterólogos de forma eficiente, además de contar con protocolos de tamizaje adecuados, que es usualmente el reto más grande (Vélez P., *et al.*, 2002; Ferrer M., 2004).

1.4.5 Métodos de análisis de la información en las bibliotecas metagenómicas.

Una vez que la biblioteca metagenómica se ha construido, existen dos metodologías para la búsqueda e identificación de genes de interés en una biblioteca metagenómica (Ekkers D. M., *et al.*, 2012):

➤ Enfoque basado en función

Consiste en la detección de la expresión del gen diana en el huésped de expresión y puede realizarse por tres caminos:

- Detección fenotípica: consiste en evidenciar un rasgo fenotípico específico para identificar los clones positivos. La detección puede ser directa, si el rasgo a observar es resultado de la expresión del gen, como la pigmentación o morfología de las colonias. También puede ser indirecta, es decir, a través de la interacción de una sustancia añadida con el producto del gen expresado.
- Detección modulada: se basa en la modulación de la expresión de los genes insertados. por ejemplo, la co-expresión de genes informadores o la complementación heteróloga, la producción de un producto génico que es necesaria para el crecimiento en condiciones selectivas.
- Inducción por sustrato: radica en la expresión inducida de genes clonados a través de un sustrato específico.

➤ Enfoque basado en secuencia

Consiste en la detección genética de las secuencias por hibridación o PCR. También puede realizarse por secuenciación completa del metagenoma, conocido como secuenciación masiva y posterior análisis computacional para la localización de genes, operones, unidades transcripcionales, elementos de control y otras señales (Wooley J. C., *et al.*, 2010; Ekkers D. M., *et al.*, 2012).

A pesar de que el estudio de los genomas microbianos comenzó a finales de 1970, en los últimos años, nuestra visión del mundo microbiano se ha ampliado y transformado gracias a las tecnologías asociadas a la metagenómica (Wooley J. C., *et al.*, 2010). La metagenómica es una prometedora estrategia de exploración de recursos biotecnológicos para explorar el potencial funcional de los microorganismos y puedan ser aplicados a procesos en la industria, la agricultura, la alimentación, la salud, el medio ambiente, etc. (Ekkers D. M., *et al.*, 2012; Knight, R., *et al.*, 2012).

2. ANTECEDENTES

El queso Cotija es un alimento con propiedades únicas y distintivas adquiridas e influenciadas por diversos factores como la materia prima, el proceso de elaboración y factores intrínsecos de la zona geográfica, entre otros. El queso Cotija es un alimento que se elabora de manera artesanal se han realizado análisis proximales, determinación de a_w , pH y acidez del alimento en diversas ocasiones. Los resultados sugieren que es un hábitat interesante de estudio por poseer un alto contenido graso (mínimo 24% BH), alto contenido de sal (hasta 4% BH), bajo a_w (máx. 0.9) y bajo pH (4.8-5.2), entre otros (García S., 2006; Hernández B., 2007; Hernández M., 2007; Bravo M., 2008).

Es importante destacar que gran parte de las características del queso se deben al metabolismo de los microorganismos presentes en la leche, los que se suman a lo largo del proceso y los que se desarrollan en la maduración (García S., 2006). Debida la importancia de la microbiota, ésta ha sido objeto de estudio desde diversos enfoques logrando poner de manifiesto que es muy abundante, variada y compleja. Se han podido identificar bacterias ácido lácticas, levaduras, bacterias halófilas, bacterias proteolíticas y bacterias lipolíticas (Tabla No. 5) (García S., 2006; Hernández M., 2007; Bravo M., 2008; Cortés D., 2009; Martínez P., 2009; Zúñiga B., 2009; Gómez C., 2010; García S., 2011; Casillas H., 2013; Avilés P., 2014).

Los estudios en el grupo de investigación hasta este momento han tratado de responder la pregunta ¿Qué microorganismos se encuentran en el queso Cotija?, utilizando diferentes enfoques. Las técnicas independientes de cultivo han permitido conocer un gran número de microorganismos, pero los resultados de las investigaciones indican que aún faltan muchos por identificar. Por ejemplo, en el 2011, Escobar-Zepeda realizó un estudio de la distribución espacial de los géneros *Bacillus*, *Enterococcus* y *Staphylococcus* (considerados hasta entonces como los principales géneros bacterianos en el alimento) por la técnica de FISH. Los resultados mostraron que los microorganismos se encuentran dispersos de manera homogénea y que la suma de los tres géneros representa sólo el 11% de la microbiota total (Escobar-Zepeda A., 2012). Por este motivo, Escobar-Zepeda realizó el análisis de la secuenciación masiva del metagenoma del queso Cotija y reveló que los microorganismos que conocemos representan sólo un pequeño porcentaje de la microbiota total (Escobar-Zepeda A., En revisión).

Por otra parte, también se ha buscado aislar los microorganismos que habitan en el alimento para explorar sus capacidades metabólicas. Entre las más estudiadas están aquellas que se relacionan con la producción de bacteriocinas y generación de aromas y sabores en el queso Cotija.

Tabla No. 5. Microorganismos identificados en el queso Cotija en trabajos previos en el grupo de investigación.

Microorganismo	Especie	Característica	Aislada o Identificada	Técnica empleada para su identificación	Referencia
<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	Lipolítica/ proteolítica	Aislada	Técnicas de microbiología tradicional ARDRA/ Amplificación de la región V3 16S ADNr	García S., 2006, García S., 2011 Hernández M., 2007
	<i>flexus</i>	Halófila/ proteolítica	Aislada	ARDRA/ Amplificación de la región V3 16S ADNr	Hernández M., 2007 Avilés P., 2014
	<i>megaterium</i>	Proteolítica	Identificada	ARDRA/ Amplificación de la región V3 16S ADNr	Hernández M., 2007
	<i>subtilis</i>	Proteolítica	Identificada	ARDRA/ Amplificación de la región V3 16S ADNr	Hernández M., 2007 García S., 2011
	<i>licheniformis</i>	Halófila/ proteolítica	Identificada	ARDRA/ Amplificación de la región V3 16S ADNr	Hernández M., 2007 Avilés P., 2014
	<i>vietnamensis</i>	-	Identificada	DGGE/Amplificación de la región V3 16S ADNr	Casillas H., 2013
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	BAL/ proteolítica	Aislada	ARDRA/ Amplificación de la región V3 16S ADNr Dependiente de cultivo/ Pruebas bioquímicas	Hernández M., 2007 Zúñiga B., 2009 Bravo M., 2008
	<i>faecium</i>	BAL	Aislada	ARDRA/ Amplificación de la región V3 16S ADNr DGGE/ Amplificación del gen rpoB Tiras API	Hernández M., 2007 Casillas H., 2013 Bravo M., 2008 Zúñiga B., 2009
	<i>asini</i>	BAL-halófila	Identificada	Amplificación de la región V4-V8 16S ADNr	Gómez C., 2010
	<i>termitis</i>	BAL-halófila	Identificada	Amplificación de la región V4-V8 16S ADNr	Gómez C., 2010
	<i>sakei</i>	BAL-halófila	Identificada	Amplificación de la región V4-V8 16S ADNr	Gómez C., 2010
<i>Lactobacillus</i>	<i>pentosus</i>	BAL	Aislada	Dependiente de cultivo/ Pruebas bioquímicas	Bravo M., 2008
	<i>plantarum</i>	BAL	Aislada	Dependiente de cultivo/ Pruebas bioquímicas	Bravo M., 2008
	<i>brevis</i>	BAL	Aislada	Dependiente de cultivo/ Pruebas bioquímicas	Bravo M., 2008
	<i>paracasei</i>	BAL	Aislada	Dependiente de cultivo/ Pruebas bioquímicas	Bravo M., 2008
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	-	Identificada	Amplificación de la región V1 16S ADNr Amplificación de la región V3 16S ADNr	García S., 2011
<i>Kocuria</i>	<i>marina</i>	Lipolítica/ proteolítica	Aislada	Amplificación del gen 16S ADNr	Robles C., 2014
	<i>rhizophila</i>	Lipolítica/ proteolítica	Aislada	Amplificación del gen 16S ADNr	Robles C., 2014

BAL- Bacteria ácido lácticas, (-) –No se ha asociado a alguna actividad enzimática o característica destacable.

Tabla No. 5. Continuación

Microorganismo	Especie	Característica	Aislada o Identificada	Técnica empleada para su identificación	Referencia
<i>Staphylococcus</i>	<i>xylosus</i>	Lipolítica	Aislada	Técnicas de microbiología tradicional ARDRA/ Amplificación de la región V3 16S ADNr	García S., 2006
	<i>piscifermentans</i>	Lipolítica	Aislada	Técnicas de microbiología tradicional ARDRA/ Amplificación de la región V3 16S ADNr	García S., 2006
	<i>saprophyticus</i>	Lipolítica	Aislada	Técnicas de microbiología tradicional ARDRA/ Amplificación de la región V3 16S ADNr	García S., 2006
	<i>sciuri</i>	Proteolítica	Identificada	ARDRA/ Amplificación de la región V3 16S ADNr	Hernández M., 2007
	<i>equorum</i>	-	Identificada	DGGE/ Secuenciación del gen <i>rpoB</i>	Casillas H., 2013
	<i>aureus</i>	-	Identificada	Amplificación de la región V1 16S ADNr	García S., 2011
	<i>warneri</i>	Lipolítica	Aislada	Amplificación del gen 16S ADNr	Robles C., 2014
<i>Streptococcus</i>	<i>infantarius</i>	-	Identificada	DGGE/ Amplificación de el gen <i>rpoB</i>	Casillas H., 2013
	<i>parasanguinis</i>	-	Identificada	DGGE/ Amplificación de el gen <i>rpoB</i>	Casillas H., 2013
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	Proteolítica	Aislada	Amplificación del gen 16S ADNr	Robles C., 2014
	<i>pneumonia</i>	.	Aislada	Amplificación del gen 16S ADNr	Robles C., 2014
<i>Paenibacillus</i>	<i>polymyxa</i>	-	Identificada	Amplificación de la región V3 16S ADNr	García S., 2011
	<i>pantothenticus</i>	-	Identificada	Amplificación de la región V3 16S ADNr	García S., 2011 Casillas H., 2013
	<i>Yagococcus</i>	<i>camiphilus</i>	BAL-halófila	Identificada	Amplificación de la región V3 16S ADNr Amplificación de la región V4-V8 16S ADNr
<i>Marinilactobacillus</i>	<i>sp.</i>	-	Identificada	Amplificación de la región V3 16S ADNr	Zúñiga B., 2009 García S., 2011
	<i>psycrotolerans</i>	-	Identificada	Amplificación de la región V3 16S ADNr	García S., 2011
<i>Brachybacterium</i>	<i>paraconglomeratus</i>	-	Aislada	Amplificación del gen 16S ADNr	Robles C., 2014
<i>Brevibacterium</i>	<i>epidermidis</i>	-	Aislada	Amplificación del gen 16S ADNr	Robles C., 2014
<i>Acinetobacter</i>	<i>lwoffii</i>	Proteolítica	Aislada	Amplificación del gen 16S ADNr	Robles C., 2014
<i>Psychrobacter</i>	<i>sp.</i>	Lipolítica	Identificada	Amplificación de la región V3 16S ADNr	García S., 2011
<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i>	Lipolítica	Aislada	Amplificación del 26S ADNr	García S., 2006
<i>Candida</i>	<i>zeylanoides</i>	Lipolítica	Aislada	Amplificación del 26S ADNr	García S., 2006

BAL- Bacteria ácido lácticas, (-) -No se ha asociado a alguna actividad enzimática o característica destacable.

En el 2008, Bravo M. aisló bacterias ácido lácticas con medios selectivos y las identificó mediante tiras API, encontrando 11 cepas de *Enterococcus faecium* y 3 cepas de *Lactobacillus plantarum*. Demostró que las bacterias coliformes disminuyen significativamente durante la maduración debido a la disminución del pH, posible efecto de bacteriocinas y otras sustancias inhibitorias como resultado del crecimiento y actividad de las BAL. Delgado A., corroboró la actividad antibacteriana de los péptidos de los sobrenadantes de cepas de *Lactobacillus* y *Enterococcus* contra microorganismos coliformes.

Respecto a la generación de aromas y sabores en el queso Cotija, inicialmente se pensó que eran el resultado de la actividad proteolítica y lipolítica de los microorganismos presentes. Por esta razón, en el 2006 García S. realizó el aislamiento de microorganismos lipolíticos y posteriormente los identificó por análisis de restricción de ADNr (ARDRA) (García S., 2006). Esto le permitió identificar bacterias del género *Staphylococcus* y levaduras como *Yarrowia lipolytica* y *Candida zeylanoides*. Adicionalmente, aisló una bacteria identificada como *Bacillus pumilus* y que más tarde, fue objeto de estudio por su presumible potencial biotecnológico. Alcántara S., obtuvo y caracterizó la lipasa recombinante LipAQC-6H de *Bacillus pumilus* QC. La lipasa de aproximadamente 20.5 kDa tiene preferencia por sustratos de p-nitrofenil ésteres de cadena corta (C4:0 y C6:0) y presenta su mayor eficiencia catalítica a pH 5.5 con NaCl al 5.5 % (p/v) (Alcántara S., 2009).

Posteriormente, se realizó un estudio para determinar las posibles fuentes de inoculación del queso Cotija con microorganismos lipolíticos a lo largo del proceso y hasta etapas tempranas de maduración. En el 2011, García S. logró aislar a los microorganismos a partir de medios de cultivo selectivos y después los identificó utilizando la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Los resultados mostraron la presencia de *Marinilactobacillus psychrotolerans*, *Psychrobacter* sp. y bacterias del género *Bacillus* en la sal de grano, bacterias del género *Staphylococcus* en todas las etapas de manufactura, *Lactococcus lactis* en leche y cuajada salada y *Bacillus pumilus* en la cuajada fresca (García S., 2011).

Por otra parte, Hernández M. trabajó en el aislamiento de microorganismos proteolíticos en quesos madurados de 3-6 meses por métodos dependientes de cultivo. Las cepas obtenidas fueron caracterizadas por métodos bioquímicos tradicionales y ARDRA. Las bacterias correspondieron a los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Enterococcus* (Hernández M., 2007).

Más tarde, Escobar-Zepeda realizó el análisis del perfil electroforético de proteínas del alimento a lo largo del radio de una pieza de queso y evidenció que la hidrólisis de las proteínas mayoritarias (caseínas) ocurre de forma homogénea dentro de la matriz. Respecto al perfil de ácidos grasos totales resultó homogéneo a lo largo del radio de la pieza de queso y es muy parecido al perfil de ácidos grasos ideal en leche cruda de vaca Holstein (de acuerdo a la American Dairy Science Association en el 2002). Sin embargo, en el perfil de ácidos grasos liberados por hidrólisis se observó la presencia de C13:0 y C18:2 cualitativa y cuantitativamente igual en todas las zonas (Escobar-Zepeda A., 2012).

3. JUSTIFICACION

El Queso Cotija es un alimento que por sus características fisicoquímicas resulta favorable para el desarrollo de ciertos grupos microbianos. Se han aislado e identificado numerosos microorganismos lipolíticos, proteolíticos y bacterias ácido lácticas a lo largo de su proceso de elaboración y maduración. Sin embargo, los microorganismos cultivables representan sólo una pequeña fracción de la microbiota del alimento, lo que limita la capacidad de exploración y uso del potencial metabólico del consorcio. La metagenómica es un enfoque que permite analizar las comunidades microbianas naturales en busca de actividades enzimáticas, incluyendo organismos que escapan a las posibilidades de cultivo en el laboratorio. Por estas razones, se propone la construcción de una biblioteca metagenómica del queso Cotija que posibilite la búsqueda y aislamiento de diversos genes de interés. La población de bacterias posee actividades metabólicas que está directamente relacionado con el desarrollo de las características sensoriales finales en el queso. En este trabajo las hidrolasas de ésteres carboxílicos resultan de interés porque contribuyen de manera importante a la generación de aromas y sabores en el alimento. Por otra parte, constituyen uno de los grupos enzimáticos más importantes en biocatálisis y han logrado impactar a diversos sectores de la industria por sus destacadas características.

4. HIPÓTESIS

La lipólisis es una actividad enzimática relevante en la producción de aromas y sabores en los quesos madurados, por lo que se podrán encontrar hidrolasas de ésteres carboxílicos en una biblioteca metagenómica del queso Cotija “Región de Origen” con al menos tres meses de maduración.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Elaborar una biblioteca metagenómica del queso Cotija e identificar hidrolasas de ésteres carboxílicos funcionales provenientes de bacterias.

5.2 Objetivos particulares

- ✓ Elaborar una biblioteca metagenómica de la microbiota del queso Cotija en bacteriófagos λ .
- ✓ Obtener clonas con actividad de CEH en el banco metagenómico.
- ✓ Obtener la secuencia de los insertos de las clonas con actividad.
- ✓ Identificar los marcos de lectura abiertos de enzimas de interés.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Diagrama experimental

En las figuras No. 9 y No. 10, se presenta el diagrama de flujo y el esquema general de la metodología de este proyecto, respectivamente.

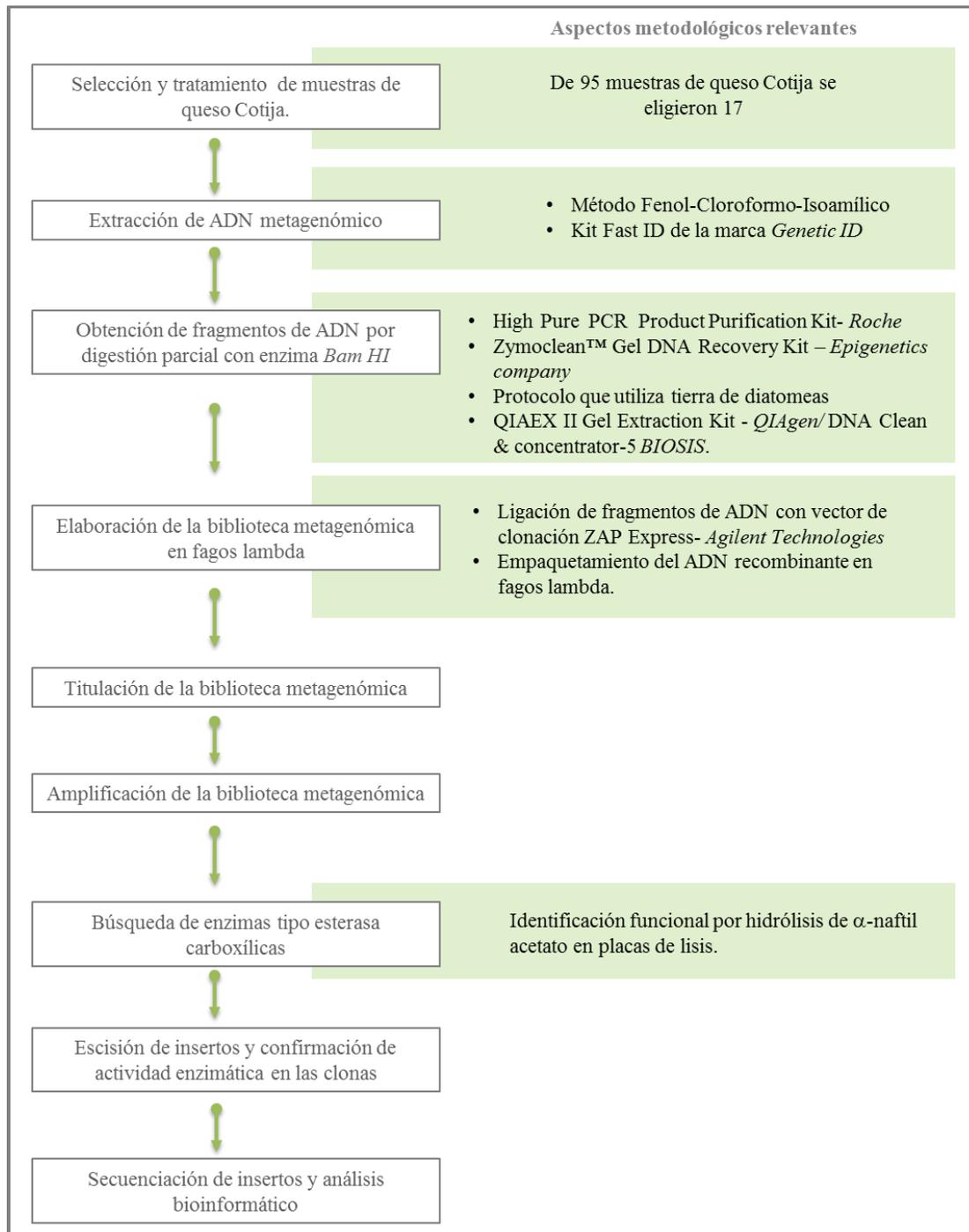
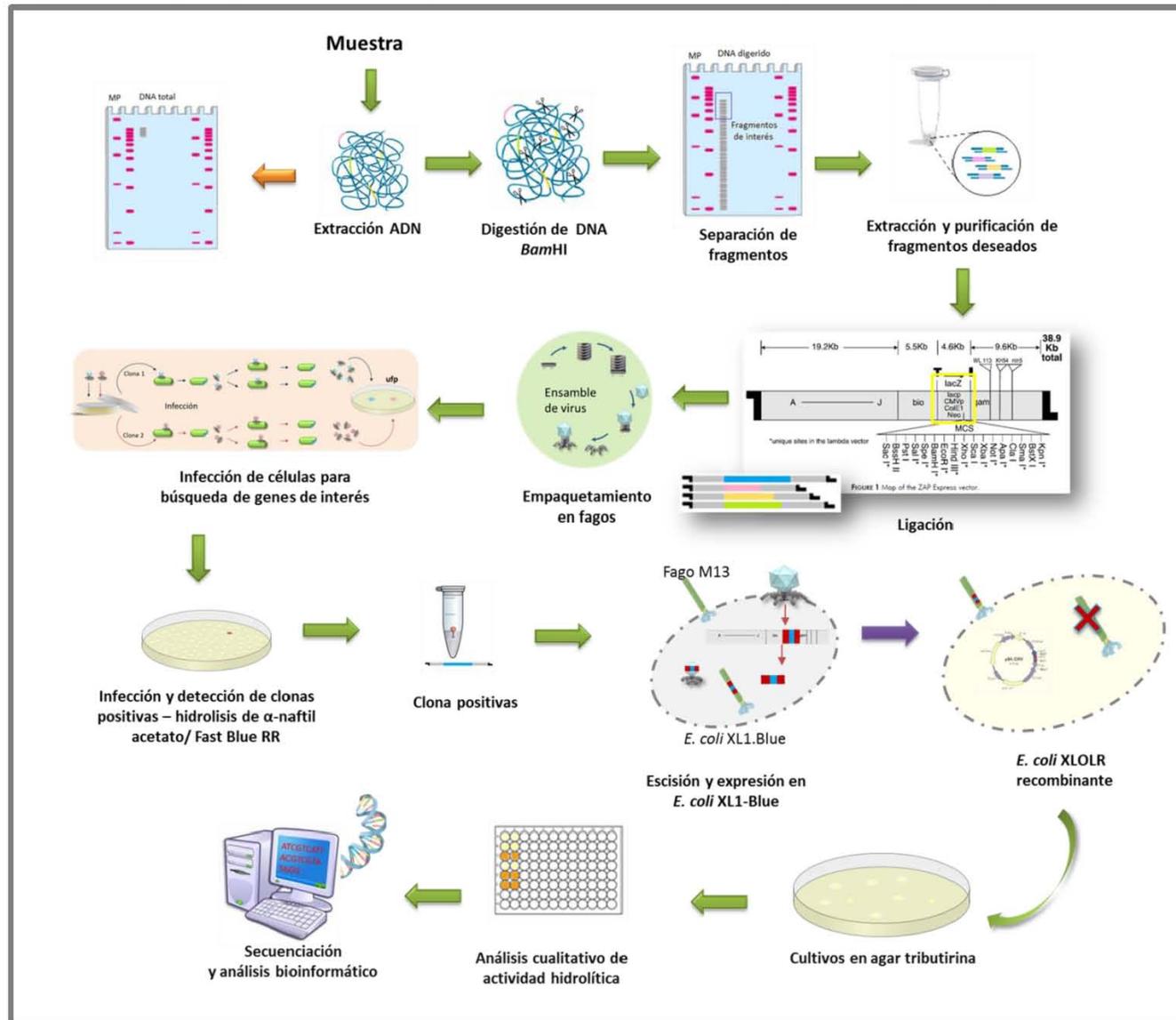


Figura No. 9. Diagrama de flujo de la metodología utilizada.

Figura No. 10. Esquema general de la metodología de la elaboración de la biblioteca metagenómica del queso Cotija.



6.2. Muestras de queso Cotija

Se utilizaron 17 muestras de queso Cotija “Región de Origen” de diferentes granjas de la zona de Jalmich, 7 de ellos pertenecen a municipios del estado de Michoacán y 10 a municipios del estado de Jalisco (Anexo 11.1). Las muestras fueron recogidas y mantenidas a -10°C hasta ser procesados para su almacenamiento. Los quesos fueron fabricados tradicionalmente y siguiendo las buenas prácticas de higiene. Los quesos cumplen con la norma NMX-F-735-COFOCALEC-201 para queso Cotija madurado. Las muestras de queso utilizadas cumplen con los siguientes parámetros fisicoquímicos:

Parámetros fisicoquímicos:	<ul style="list-style-type: none"> • a_w: ≤ 0.90 • Humedad: Máx. 36 % • Contenido de grasa (BH): Mínimo 23 % • Contenido de proteína (BH): Mín. 25 %
Parámetros microbiológicos:	<ul style="list-style-type: none"> • Cuenta de <i>Staphylococcus aureus</i> < 100 UFC/g • Ausencia de <i>Salmonella</i> sp. por cuenta en placa • Ausencia (por qPCR): <ul style="list-style-type: none"> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Brucella</i> spp <i>Escherichia coli</i> ETEC <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Complejo <i>Mycobacterium</i> (<i>Mycobacterium bovis</i>) • Cuenta de bacterias mesófilas aerobias: $10^5 - 10^6$ UFC/g • Organismos coliformes totales: 100 - 300 UFC/g

6.3. Proceso para el almacenamiento de muestras de queso Cotija

El procesamiento de las muestras se realizó en condiciones estériles. Los utensilios necesarios (procesador, tabla, cuchillos, cucharas) fueron lavados y esterilizados por inmersión en una solución de hipoclorito al 10 % (v/v), un posterior enjuague con etanol al 75 % (v/v) y finalmente fueron expuestos a la luz UV por 5 min. Se retiró la corteza de los quesos con un cuchillo y se cortaron en trozos pequeños con otro cuchillo. Los pedazos de muestra se trituraron en cantidades de 100 g aproximadamente con un procesador para alimentos. Posteriormente, cada 25 g de queso procesado fueron vaciados a una bolsa estéril con cierre zipper etiquetada para su almacenamiento a -70°C .

6.4. Obtención del metagenoma de la microbiota del queso Cotija

En el grupo de trabajo, desde hace algunos años se desarrolló un protocolo de obtención del paquete celular de los microorganismos que se encuentran alojados en la matriz del queso Cotija, superando los problemas causados por el alto contenido graso o proteínico (Zuñiga B., 2009). Sin embargo, este paquete celular acarrea ADN de vaca (*Bos taurus*) proveniente de las células somáticas contenidas en la leche con la que se elabora el queso. Las células somáticas (CS) son células que poseen núcleo y proceden del torrente sanguíneo o de la piel de la ubre o del pezón de la vaca. El conteo de células somáticas es usado como un indicador de la salud de la glándula mamaria y a su vez de la calidad de la leche obtenida (Pinto R., 2013; PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2012). Escobar-Zepeda realizó modificaciones al protocolo para eliminar el ADN de vaca y garantizar que el mayor porcentaje de ADN en estudio fuera de los microorganismos que se desarrollan en la matriz alimentaria. El tratamiento consistió en la digestión del ADN exógeno en el paquete celular con DNasa, antes de iniciar el proceso de ruptura celular para extracción de ADN metagenómico (Escobar-Zepeda, En revisión). Este paso se considera en las dos metodologías probadas para extracción del ADN. La recuperación del paquete celular a partir del queso Cotija se llevó a cabo sin previo enriquecimiento de microorganismos (Anexo 11.2 y 11.3). La extracción del ADN se realizó con el Kit Fast ID *Genetic ID* y con el método tradicional Fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1) (Anexo 11.4 y 11.5). En el caso de esta última, se adicionó un paso de purificación con el kit QIAquick *QIAgen* (Anexo 11.5).

6.5. Cuantificación de ADN y determinación de la pureza

La cantidad del ADN extraído se cuantificó midiendo la absorbancia de 2 µL de solución a una longitud de onda de 260 nm (Abs_{260nm}) en un espectrofotómetro para microplacas *Epoch, BioTek* y el software Gen5 1.10. La pureza del ADN extraído con respecto a la contaminación por proteínas, se estimó con el cociente $Abs_{260nm} / Abs_{280nm}$. El valor deseado de esta relación es 1.8-2, lo que significa que el ADN tiene la pureza suficiente. Adicional a las mediciones espectrofotométricas, se evaluó la integridad del ADN por electroforesis en un gel de agarosa 1 % (p/v). Y en algunos casos se evaluó la calidad del ADN mediante amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S por PCR punto final.

6.6. Reacciones de PCR para evaluar la calidad del ADN metagenómico

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Marca *Techgene, Techne*. Se amplificó la región V3 de la subunidad 16S del ribosoma bacteriano como indicador de la pureza del ADN extraído. En las Tabla No. 6 y 7 se muestran los componentes y las condiciones de la reacción, respectivamente.

Se utilizaron los siguientes cebadores universales (Ercolini D., 2003):

- 338F- 5' ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG 3' que ocupan de la posición 338-357 de la región V3 del gen ribosomal 16S.
- B518R- 5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3' que ocupan de la posición 518- 534 de la región V3 del gen ribosomal 16S.

Tabla No. 6. Componentes de la reacción de PCR para amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S. Se utilizó *Taq Polimerasa (Thermo Scientific)*.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción
Agua	-	-	
Master Mix Taq Man (Enzima, Buffer, dNTP's)	2 X	1 X	12.5
Cebador 338F	100 μ M	0.4 μ M	1 μ L
Cebador B518 R	100 μ M	0.4 μ M	1 μ L
ADN	-	50 ng totales	
Volumen final	-	-	25 μ L

Tabla No. 7. Condiciones del termociclador para la PCR para amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S.

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	5 min
	94 °C	1 min
20	65 °C	1 min
	72 °C	3 min
	94 °C	1 min
10	55 °C	1 min
	72 °C	3 min
1	72 °C	1 min

Al final de la reacción, esperaba obtenerse un amplicón de 250 pb.

6.7. Fragmentación del ADN

La fragmentación del ADN se realizó con las enzimas *Sau3AI* y *BamHI* (*Promega*). Las reacciones de digestión con 400 ng de ADN se realizaron bajo condiciones variables de tiempo y concentración de enzima a 37 °C. Las enzimas fueron inactivadas por incubación a 65 °C durante 15 min. El patrón de fragmentación fue visualizado en geles de agarosa al 0.7 % (p/v) en buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8 \pm 0.2). La tinción de los geles de agarosa se llevó a cabo por inmersión en una solución de bromuro de etidio 0.5 μ g/mL en agua desionizada, filtrada y esterilizada. La diferencia de potencial aplicada fue de 90 volts durante 40 min. El marcador de tamaño molecular utilizado fue GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder *Thermo Scientific* (Anexo 11.7).

Las diluciones de enzimas requeridas se realizaron con agua grado biología molecular, buffer MULTI-CORE™ y albumina sérica bovina (ABS) a concentración final 1X. Debido a que las enzimas no se almacenan bien en buffer de reacción, las diluciones se utilizaron inmediatamente o se almacenaron a -20 °C por no más de una semana (de acuerdo a los protocolos reportados por *Promega*).

6.8. Procedimiento de corte de banda a partir de gel de agarosa

Las electroforesis realizadas con el objetivo de cortar la banda de ADN que contenía los fragmentos de interés, se sometieron al proceso de tinción que se describe a continuación:

Se utilizó agarosa bajo punto de fusión sin adición de bromuro de etidio (el ADN que será clonado no debe ser expuesto a la luz UV bajo ninguna circunstancia debido a que la eficiencia de la clonación podría verse disminuida en 100 veces o más) (*Epicentre*, 2012).

El marcador de tamaño molecular y el control de la reacción de digestión parcial se depositaron en los pozos de los laterales del gel, mientras que la reacción de digestión, escalada y concentrada por calentamiento al vacío de 100 μ L a 30 μ L se depositó en un pozo central. Se aplicó una diferencia de potencial de 80 V durante 1 hora utilizando buffer TAE 1X. Al finalizar, el gel se depositó en una hoja de acetato con papel milimétrico como fondo para realizar el corte de los dos carriles laterales (Figura No. 11, lado izquierdo).

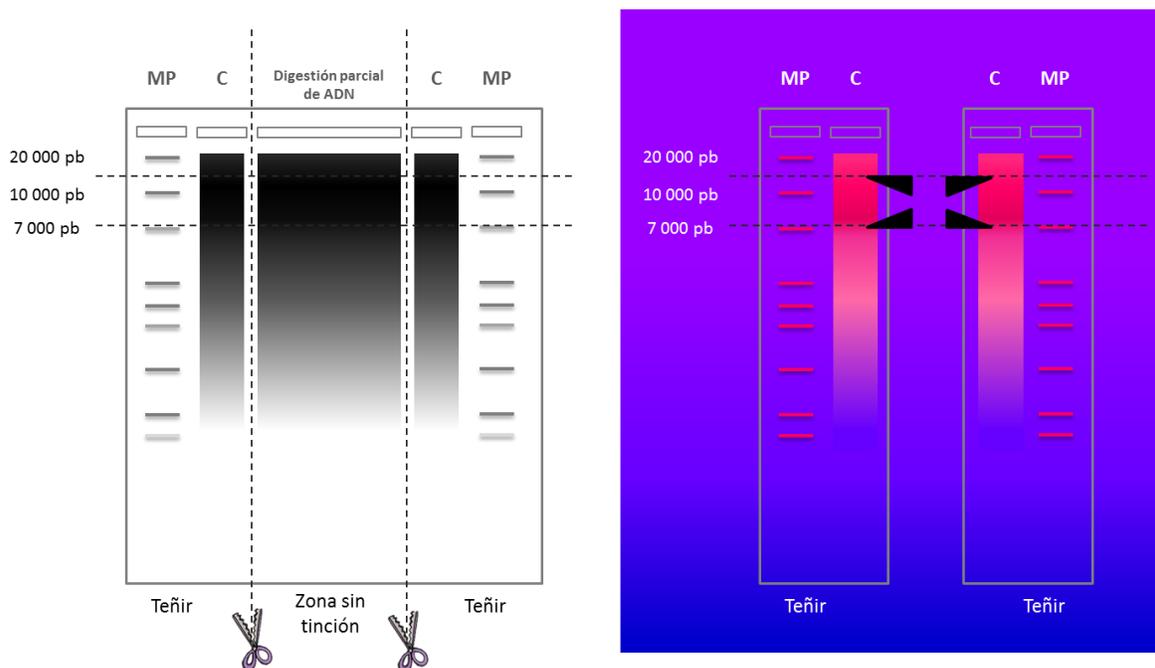


Figura No. 11. Procedimiento del corte de banda de agarosa que contiene los fragmentos de ADN. Lado izquierdo) Corte de carriles laterales para tinción con bromuro de etidio. Lado derecho) Exposición de carriles laterales a la luz UV para marcar la zona de interés. MP: Marcador de tamaño, C: reacción de digestión enzimática parcial.

Los laterales del gel fueron sumergidos en una solución de bromuro de etidio 0.5 μ g/mL durante 10 min y enjuagado en agua destilada estéril por 5 min. Posteriormente fueron expuestos a la luz UV para poder realizar unas muescas que delimitaran el área de interés (Figura No.11, lado derecho).

Finalmente, se empalmaron los tres segmentos del gel (sin exposición a la luz UV) y se cortó el área delimitada por las muescas en la zona central del gel. Esta banda de agarosa se dividió en trozos de 250 mg aproximadamente y se depositaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL (los trozos de agarosa pueden ser almacenados a -20 °C).

6.9. Recuperación de fragmentos de ADN en agarosa

Los fragmentos de ADN de 7 a 12 kpb obtenidos por digestión parcial fueron purificados por diferentes metodologías:

- Protocolo del Kit High Pure PCR Product Purification *Roche* (Anexo 11.8).
- Protocolo del kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery *Zymoreserch* (Anexo 11.9).
- Protocolo que utiliza tierra de diatomeas (Anexo 11.10).
- Protocolo de QIAEX II *QIAGEN*/ DNA clean & concentrator-5 *BIOSIS* (Anexo 11.11 y 11.12).

6.10. Elaboración de la biblioteca metagenómica

La biblioteca metagenómica se realizó utilizando el sistema ZAP Express Predigested Vector Kit and ZAP Express Predigested Gigapack Cloning Kits *Bam*HI/CIAP-Treated, *Agilent Technologies*, este protocolo emplea al ADN de fago lambda como vector de clonación (Anexo 11.13).

La construcción de la biblioteca metagenómica consta de dos pasos fundamentales: la ligación de los fragmentos de ADN con el vector ZAP Express y el empaquetamiento del vector recombinante en las partículas virales de fago λ .

6.10.1. Reacción de ligación

Antes de realizar la ligación, el vector y los fragmentos de ADN fueron calentados a 55 °C durante 10 min e inmediatamente enfriados en hielo por dos minutos (Mei-Fong N., *et al*, 2008). Posteriormente, se adicionaron los demás reactivos de acuerdo a la tabla No. 8, para llevar a cabo la ligación de los fragmentos de ADN purificados con el vector ZAP Express.

Tabla No. 8. Mezcla de reacción de ligación con el vector ZAP Express. *Enzima T4 DNA ligasa *Invitogen*.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen adicionado
Agua	-	-	-
Buffer ligasa T4	5X	1X	1.1 μ L
ADN inserto	0.213 μ g/ μ L	-	2.5 μ L
Vector ZAP Express	1 μ g/ μ L	-	1 μ L
Enzima T4 DNA ligasa *	1U/ μ L	-	1 μ L
Volumen final de reacción			5.6 μ L

La reacción de ligación se inactivó a 65 °C durante 10 min.

6.10.2. Comprobación de la reacción de ligación

Se corroboró la eficiencia de la reacción de ligación mediante Lig-PCR antes de empaquetar las construcciones de ADN en las partículas víricas (Chandra P., *et al.*, 2005).

Se utilizaron 1.5 µL de la mezcla de reacción de ligación y los cebadores universales T7 y T3 que franquean el sitio de inserción en el vector ZAP express. Las condiciones de la reacción de Lig-PCR se muestran en la Tabla No. 9 y Tabla No. 10.

Tabla No. 9. Componentes de la reacción de Lig-PCR utilizando *Long PCR Enzyme Mix*.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción
Agua grado biología molecular	-	-	17.8 µL
Buffer Long PCR con MgCl ₂ 15 mM	10X	1X	2.5 µL
Mezcla de dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5 µL
Cebador promotor T7 (Forward)	10 µM	0.5 µM	1.25 µL
Cebador promotor T3 (Reverse)	10 µM	0.5 µM	1.25 µL
Mezcla de reacción de ligación	-	-	1.5 µL
Long PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific)	5U/ µL	1 U	0.20 µL
Volumen final	-	-	25 µL

Tabla No. 10. Condiciones del termociclador para la reacción de Lig-PCR.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	3 min	1
Desnaturalización	94 °C	20 s	10
Alineación (Tm-5)	51°C	30 s	
Extensión	68 °C	7 min	
Desnaturalización	94 °C	20 s	25
Alineación	51 °C	30 s	
Extensión	68 °C	7 min + 5 s	
Extensión Final	68 °C	10 min	1

El producto de PCR representa las moléculas recombinantes que se generan durante la ligación y su tamaño debe ser aproximado a 6 kpb. El producto de PCR obtenido a partir del vector sin ningún inserto tendría un tamaño aproximado de 165 pb (Anexo 11.14).

6.10.3. Empaquetamiento

El empaquetamiento se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor. Dado que se realizaron algunas modificaciones al protocolo de ligación reportado en el manual, éste se describe en la sección de resultados. La reacción de empaquetamiento se describe a continuación con detalle.

1. Una vez terminada la reacción de ligación se mantuvo a 4 °C.
2. Posteriormente se realizó el empaquetamiento del ADN recombinante en el fago lambda en campana de flujo laminar.
3. Los extractos de empaquetamiento se descongelaron gradualmente tomando el tubo entre los dedos.
4. Se adicionaron 4 µL la reacción de ligación a 25 µL de extractos de empaquetamiento. Se mezcló de manera envolvente, sin pipetear, ni formar, burbujas.
5. Se centrifugó a máxima velocidad por 5 s el tubo de reacción para bajar todo el contenido.
6. La reacción se incubó en un baño de agua precalentado a 22 °C en un equipo *Eppendorf Thermomixer* durante 2 horas (sin exceder el tiempo).
7. Finalmente, se adicionaron 500 µL de Buffer SM y 20 µL de cloroformo.
8. Se mezcló de manera envolvente con la pipeta y se centrifugó a máxima velocidad por 5 s para bajar los restos de empaquetamiento. Se almacenó a 4 °C.

El buffer SM, los medios de cultivo y otras soluciones se prepararon siguiendo los protocolos descritos en los anexos 11.15, 11.16 y 11.17.

6.11. Titulación de la biblioteca metagenómica

La titulación de la biblioteca metagenómica se realizó con el objetivo de conocer el número de fagos contenidos en la misma, de la siguiente forma:

La biblioteca metagenómica fue diluida con el volumen adecuado de buffer SM para obtener las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . Posteriormente se adicionan 2 µL de cada dilución de fagos a 200 µL de células *E. coli* XL1-Blue MRF' a una $D.O_{600nm} = 0.5$ resuspendidas en una solución 10 mM de $MgSO_4$ (cultivo realizado en medio LB con suplementos) (Anexo 11.18). Se incubaron las células y los fagos a 37 °C durante 15 min, sin agitación. Después de la incubación, se adicionó la mezcla de infección (bacterias y fagos) a 6 mL de agar suave NZY a 56 °C y se mezcló por inversión. El agar suave se vertió y homogenizó sobre una placa de agar NZY sólido. Se dejó secar durante 10 min y se incubó a 37 °C durante 18 horas. Finalmente se contaron las unidades formadoras de placa (UFP). Se calculó el número de fagos que conforman la biblioteca metagenómica con la siguiente ecuación:

$$\text{Número de fagos en la biblioteca metagenómica} = \frac{(\text{Número de UFP} \times \text{Inverso de la dilución})}{\mu\text{L usados para infectar bacterias}} \times \mu\text{L totales de biblioteca metagenómica}$$

Para calcular el número de fagos existentes debe tomarse en cuenta aquellas placas donde el conteo de UFP se encuentre entre 30-300 en placas Petri de 100 mm.

6.12. Amplificación de la biblioteca metagenómica

La cantidad obtenida de la biblioteca metagenómica, con el Kit ZAP Express de *Agilent Technologies* fue aproximadamente de 500 μL , por lo cual fue necesario realizar una amplificación para garantizar que el ADN genómico a analizar no sea limitante de posteriores análisis.

El procedimiento de amplificación se realizó de igual forma que la titulación pero a mayor escala. La infección se realizó con un volumen aproximado de 250 μL de fagos en 600 μL de células *E. coli* XL1-Blue MRF' a una $\text{D.O.}_{600\text{nm}} = 0.5$ resuspendidas en una solución 10 mM de MgSO_4 . Se utilizaron 30 mL de agar suave NZY para sembrar las bacterias lisadas en la placa de agar NZY de 300 mm x 300 mm. Se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Al siguiente día, se agregaron 15 mL de amortiguador SM y se dejó en agitación orbital a 4 °C durante 6 h (procurando que el amortiguador recolectara todos los fagos).

Posteriormente, se recogió el amortiguador SM en un tubo falcón estéril de 50 mL, se enjuagó la placa con otros 5 mL de buffer SM y se agitó por 30 min más. Se adicionó cloroformo a una concentración final de 5 % (v/v). Se mezcló e incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a $500 \times g$ durante 10 min. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo falcón estéril. Se repitió la adición de cloroformo a una concentración final de 5 % (v/v), incubación y centrifugación. Finalmente el sobrenadante recolectado se distribuyó en criotubos adicionando 1.5 mL en cada uno. Se adicionó cloroformo a una concentración final de 0.3 % (v/v) para ser almacenados a 4 °C y DMSO a una concentración final 0.7 % (v/v) para almacenar a -80 °C.

6.13. Búsqueda de actividades carboxilesterasa/lipasa

La búsqueda de actividad CEH en el banco metagenómico de queso Cotija se realizó con el método de identificación funcional basado en la hidrólisis de α -naftil ésteres. Primero, se infectaron células hospederas con los fagos del banco metagenómico, de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Se realizó un cultivo en 50 mL de medio LB con suplementos de la cepa *E. coli* XL1-Blue MRF' a 37 °C hasta una $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ de 0.5.
2. De acuerdo a la titulación de la biblioteca metagenómica, se calculó la dilución necesaria de la biblioteca para realizar infecciones que formaran entre 30 y 300 UFP por placa de medio NZY.
3. Se tomaron 2 μL de la dilución adecuada y se infectaron 200 μL de células, se incubó a 37 °C durante 15 min.
4. Se calentó con anterioridad el agar NZY suave (con 1mM IPTG) hasta tenerlo líquido y se mantuvo en calentamiento a 56 °C. Se añadió la mezcla de infección al agar suave, se mezcló por inversión y se vació sobre cajas de Petri que contienen medio NZY sólido (con 1 mM IPTG).
5. Se dejó secar 10 min y posteriormente se incubó a 37 °C durante 12 h o hasta que se observó crecimiento microbiano y su lisis.

La búsqueda de enzimas lipolíticas en el banco metagenómico de Queso Cotija se realizó con el método de identificación funcional basado en la hidrólisis de α -naftil ésteres (Anexo 11.19). Cada uno de las UFP positivos detectados, fueron tomados de la caja Petri con ayuda de una pipeta Pasteur con bulbo y fueron depositados en un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 500 μ L de buffer SM y 1 gota de cloroformo (aproximadamente 2 μ L). Los tubos fueron almacenados a 4 °C.

6.14. Escisión del vector pBK-CMV

La escisión *in vivo* es un paso de subclonación del ADN insertado en el fago λ para facilitar su manipulación en pasos subsiguientes. Para realizar este procedimiento es indispensable llevar a cabo una coinfección de células *E. coli* XL1-Blue con los fagos λ y M13 (fago ayudador), de esta manera, las proteínas del fago M13 realizan una replicación monocatenaria cuando reconoce el origen de replicación *f1* en el ADN del fago λ . La molécula de ADNss que se circulariza, contiene las secuencias del vector pBK-CMV y el inserto. El fagémido es empaquetado en las partículas del fago M13 y excretado por la célula *E. coli* XL1-Blue. En una segunda etapa, las células de *E. coli* XL1-Blue y el fago lambda son lisadas por calentamiento de la mezcla de reacción a 70 °C. El fago M13 que contiene el fagémido pBK-CMV no es afectado por la temperatura y es utilizado para infectar células *E. coli* XL0LR, que pueden ser plateado en medios selectivos para formar colonias y posteriormente ser reanalizadas.

Una vez que se seleccionaron los fagos positivos, se almacenaron los trozos de agar que los contenían en buffer SM y cloroformo. Posteriormente, se realizó el protocolo para escindir la región del ADN del fago lambda recombinante, que será el vector de expresión recombinante en la bacteria *E. coli* XL0LR (Anexo 11.20).

6.15. Conservación de cepas

Se realizó un cultivo de las cepas *E. coli* XL0LR y *E. coli* XL1-Blue MRF' a partir de una colonia en medio LB con tetraciclina 12.5 μ g/mL hasta una D.O._{600 nm} de 0.5 a 0.8 a 37 °C a 250 rpm. En el caso de las clonas hidrolasa positivas se realizó un cultivo en medio LB con kan (50 μ g/mL) a partir de una colonia hasta una D.O._{600 nm} de 0.5 a 0.8 a 37 °C a 250 rpm. Posteriormente, las cepas fueron conservadas en glicerol al 25 % (v/v) y almacenadas a -70 °C.

6.16. Aislamiento del contenido intracelular y extracelular

Se realizó un preinóculo de células *E. coli* XL0LR recombinantes en caldo LB con kan (50 μ g/mL) a partir de una colonia a 37 °C a 100 rpm, durante toda la noche. Se inoculó un cultivo de 25 mL de caldo LB con kan (50 μ g/mL) a 37 °C a 250 rpm hasta una D.O._{600 nm} = 0.9-1. La expresión de las proteínas se indujo con la adición de IPTG para lograr una concentración final de 0.4 mM y se incubó a 37 °C a 250 rpm, por 3 h. Se colectaron las células por centrifugación a 8000 x g durante 15 min y posteriormente se realizaron dos lavados con buffer de fosfato de potasio 50 mM pH 7.5, a 4 °C. El sobrenadante se almacenó en un tubo limpio y estéril.

El paquete celular se resuspendió en buffer de lisis (1mM EDTA, 0.3 M NaCl, 10 % (v/v) glicerol, 1 mg/mL de lisozima en buffer de fosfatos de potasio 50 mM pH 7.5) en un volumen equivalente al

10 % (v/v) del cultivo inicial y se incubó a 30 °C durante 20 min. Los extractos celulares de *E. coli* se sonicaron en hielo (3 veces por 2 min, potencia 4 y 5, 50 % “de salida”, en un sonicador *Dismembrator F550, Fisher Scientific*) (Peña M., 2009).

6.17. Determinación de proteína por el método de Bradford

En una microplaca se colocaron 160 µL de la muestra (en caso del blanco se utilizó buffer de fosfatos 50 mM) en pozos independientes, por duplicado, y 40 µL del reactivo de Bradford (*Bio-RadTM*). Se homogenizó e incubó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se determinaron las concentraciones en el espectrofotómetro para microplacas utilizando una curva patrón de ABS (Anexo 11.21). Para las muestras de extracto extracelular y contenido intracelular se realizaron diluciones de 1:1000 y 1:100 respectivamente con buffer de fosfatos 50 mM (Bradford M., 1976).

6.18. Evaluación cualitativa de actividad enzimática en microplaca

Se evaluó de manera cualitativa la actividad hidrolítica de cada clona en microplaca utilizando soluciones de α -naftil acetato como sustrato (solución A) y Fast Red como revelador (solución B). Se adicionaron 75 µL de solución de extracto extracelular o intracelular (se ajustó previamente la concentración de proteína de todas las muestras) y 75 µL de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.5 como blanco del ensayo. A continuación se adicionó a cada pozo 75 µL de la solución A y se dejó incubar por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 75 µL de la solución B. El cambio de color de cada solución a color marrón está relacionado con la actividad enzimática hidrolítica en los extractos proteínicos (Castro R., 2014).

- Solución A: 3 mM α -naftil acetato, 10 % (v/v) acetona en 100 mM de amortiguador de fosfatos pH 7.5.
- Solución B: 1 mM Fast Red TR, 0.1 % (v/v), tritón X-100 en 100 mM de amortiguador de fosfatos pH 7.5.

6.19. Extracción de plásmido pBK-CMV de clonas positivas

La recuperación de plásmido pBK-CMV recombinante se realizó con el Kit Gene JETTM Plasmid Miniprep a partir de 5 mL de cultivo de células *E. coli* XLOLR recombinantes en caldo LB con kan 50 µg/mL a partir de una colonia hasta una D.O. _{600 nm} de 0.8 a 1 a 37 °C a 250 rpm.

6.20. Diseño de cebadores para secuenciación del inserto de la clona I

Los cebadores utilizados para la secuenciación de la clona I, fueron diseñados con ayuda de la herramienta PrimerQuest de IDT estableciendo una longitud óptima de 20 pb, una T_m de 62 °C y 50 % CG. Los cebadores fueron analizados y seleccionados con base en los criterios que arroja la herramienta Oligoanalyzer de IDT (PrimerQuest® program, IDT, 2012) (Tabla No. 11).

Tabla No. 11. Cebadores utilizados para la secuenciación completa del inserto de la clona I.

Nombre cebador	Secuencia	Características	
T7 (Directo)	5'- GTAATACGACTCACTATAGGGC -3'	T _m = 56.1 °C	GC %= 45.5
T3 (Reverso)	5'- AATTAACCCTCACTAAAGGG -3'	T _m = 56.3 °C	GC %=40
106F (Directo)	5'- GACAGCTCCTCTCAAATTCCT -3'	T _m = 62 °C	GC %= 45.5
106R (Reverso)	5'- TCCACCGAATGACTAAGGTTTC -3'	T _m =62 °C	GC %= 45.5

6.21. Amplificación del inserto de la clona I para secuenciación

La amplificación del inserto de la clona I se utilizaron los cebadores universales T7/ T3 y la reacción se llevó a cabo en un termociclador Marca *Techgene, Techne*. En las Tabla No. 12 y 13 se muestran los componentes y las condiciones de la reacción, respectivamente.

Tabla No. 12. Componentes de la reacción de PCR para amplificar el inserto de la clona I. Se utilizó Long PCR Mix (*Thermo Scientific*).

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción
Agua	-	-	
Buffer Long PCR mix con 15 mM MgCl ₂	10X	1X	2.5 µL
Cebador T7	10 µM	0.5 µM	1.25 µL
Cebador T3	10 µM	0.5 µM	1.25 µL
dNTP's	2 mM	0.2 mM	2.5 µL
ADN	-	150 ng totales	
Enzima Long PCR Mix	5U	1U	0.2
Volumen final	-	-	25 µL

Tabla No. 13. Condiciones del termociclador para la PCR para amplificar el inserto de la clona I. Se utilizó Long PCR Mix (*Thermo Scientific*). El tamaño de inserto fue aproximadamente de 6 kpb.

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	3 min
10	94 °C	20 s
	51 °C	30 s
25	68 °C	4 min
	94 °C	20 s
	51 °C	30 s
1	68 °C	4 min + 2 s
	68 °C	10 min

6.22. Secuenciación de insertos

La secuenciación de los insertos se realizó directamente en plásmido mediante el servicio Primer Walking, Macrogen (Humanizing Genomics Macrogen, 2015).

6.23. Análisis bioinformático

Los ensamblajes de las secuencias nucleotídicas se realizaron con el programa MultAlin versión 5.4.1, se utilizó la matriz blosum 62, una penalización de 12 por apertura de gap y 2 por extensión de gap (Corpet F., 1988). Los alineamientos pareados entre las secuencias de nucleótidos se realizaron con las herramientas EMBOSS-Water, utiliza una matriz blosum 62, una penalización de 10 por apertura de gap y 0.5 por extensión de gap. También se utilizó EMBOSS-Needle utiliza una matriz blosum 62, una penalización de 10 por apertura de gap dentro y al final de cada secuencia y 0.5 por extensión de gap dentro y al final de cada secuencia (Li W., *et al.*, 2015). Los alineamientos múltiples se realizaron utilizando el programa CLC Genomics Workbench 7.6, se utilizó una penalización de 10 por apertura de gap y una penalización de 1 por extensión de gap (CLC bio, Aarhus, Dinamarca). Los marcos abiertos de lectura fueron identificados utilizando el programa GeneMark.hmm versión 3.25 con modelos heurísticos, se realizó la predicción de ORF en ambas hebras utilizando el código genético 11 (Besemer J., *et al.*, 2005; Kong L., *et al.*, 2007). Las secuencias de aminoácidos de las proteínas predichas fueron comparadas contra la base de datos no redundante (NR) BLASTp, con longitud mínima de ensamble de 100, matriz blosum 62, penalización de 11 por apertura de gap y penalización de 1 por extensión de gap (Altschul S.F., *et al.*, 1990). Simultáneamente, se alinearon las secuencias de nucleótidos de las clonas con la base de datos no redundante uniprotkb de UniProt, utilizando la matriz blosum 62 (The UniProt Consortium, 2015). Adicionalmente, se alinearon las secuencias predichas como ORF con la base de datos Pfam, para la anotación consensada de genes (Finn R., *et al.*, 2014). Por otro lado, se buscaron motivos proteínicos dentro de los marcos abiertos de lectura para cada clona con la herramienta ProSite-ExPasy (De Castro E., *et al.*, 2006). La predicción de la estructura secundaria de los marcos abiertos de lectura se realizó con el servidor Jpred 4-ExPasy (Drozdetskiy A., *et al.*, 2015). Las secuencias nucleotídicas fueron alineadas contra la base de datos no redundante (NR/nt) BLASTn con longitud mínima de ensamble de 100 y los parámetros estándar (Altschul S. F., *et al.*, 1990).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1.Extracción de ADN metagenómico

El ADN extraído con el kit Fast ID *Genetic ID* se visualizó en gel de agarosa ligeramente degradado (Figura No. 12 A). La pureza del ADN extraído se evaluó mediante una reacción de PCR, debido a que, la enzima ADN polimerasa es muy sensible a altas concentraciones de iones y contaminantes como fenol o cloroformo, entre otros. Por lo tanto, se realizó la amplificación de la región V3 del ADN ribosomal 16S para comprobar la calidad amplificable del material genético. El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa en el tamaño esperado (200 pb) (Figura No. 12 B carril 3).

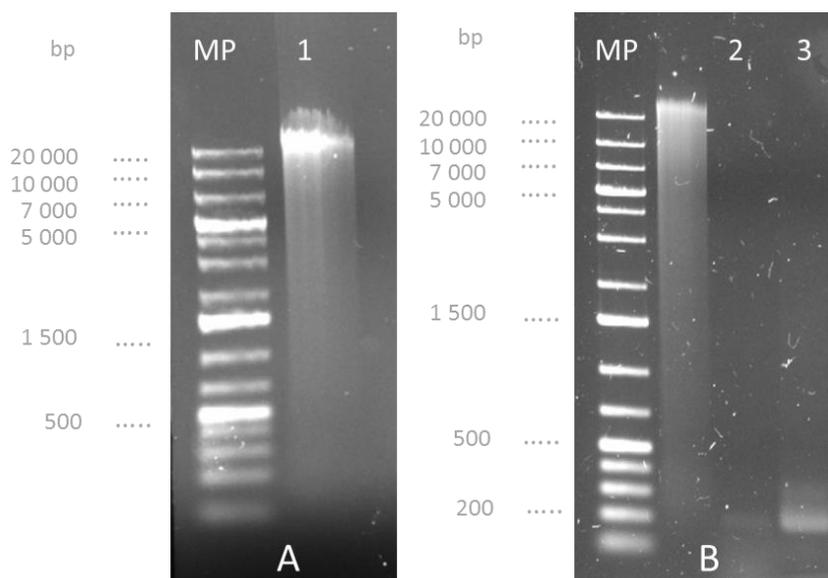


Figura No. 12. ADN metagenómico de la microbiota del queso Cotija extraído con el kit Fast ID *Genetic ID*. Panel A) MP- Marcador de tamaño molecular GeneRuler 1Kb Plus *Thermo Scientific*. 1- ADN metagenómico extraído con el kit Fast ID. Panel B) MP- Marcador de tamaño molecular GeneRuler 1Kb Plus *Thermo Scientific*. 2) Control negativo de la amplificación del gen ribosomal 16S a partir del ADN extraído. 3) Producto de PCR del gen ribosomal 16S a partir del ADN metagenómico extraído con el Kit Fast ID.

La segunda metodología probada fue la extracción con PCI que utiliza lisozima y mutanolisina para la lisis celular. La integridad del ADN fue evaluada mediante una electroforesis en gel de agarosa y como puede observarse en la Figura No. 13 panel A, el ADN es de alto peso molecular y sin degradación. Posteriormente, el ADN obtenido se concentró y purificó con el kit QIAquick *QIAGEN*. Adicionalmente, se realizó una reacción de PCR punto final de la región V3 del gen ribosomal 16S con el ADN antes y después de la purificación con el kit QIAquick *QIAGEN* para determinar la calidad y pureza del ADN obtenido. Los amplicones fueron visualizados en gel de agarosa en el tamaño esperado (200 pb) (Figura No. 13 B). Sin embargo, la intensidad del amplicón se aprecia de manera tenue comparada contra una muestra de ADN extraído por la misma técnica con un paso adicional de purificación en columna (QIAquick- *QIAGEN*).

A pesar de que esta metodología es ampliamente utilizada, es bien sabido que la purificación de ADN puede acarrear compuestos que inhiban (proteínas, detergentes, sales, agentes quelantes, etanol, solventes orgánicos como fenol o cloroformo, entre otros) reacciones posteriores. Sin embargo, el paso adicional de purificación en columna garantiza la eliminación de compuestos contaminantes del ADN.

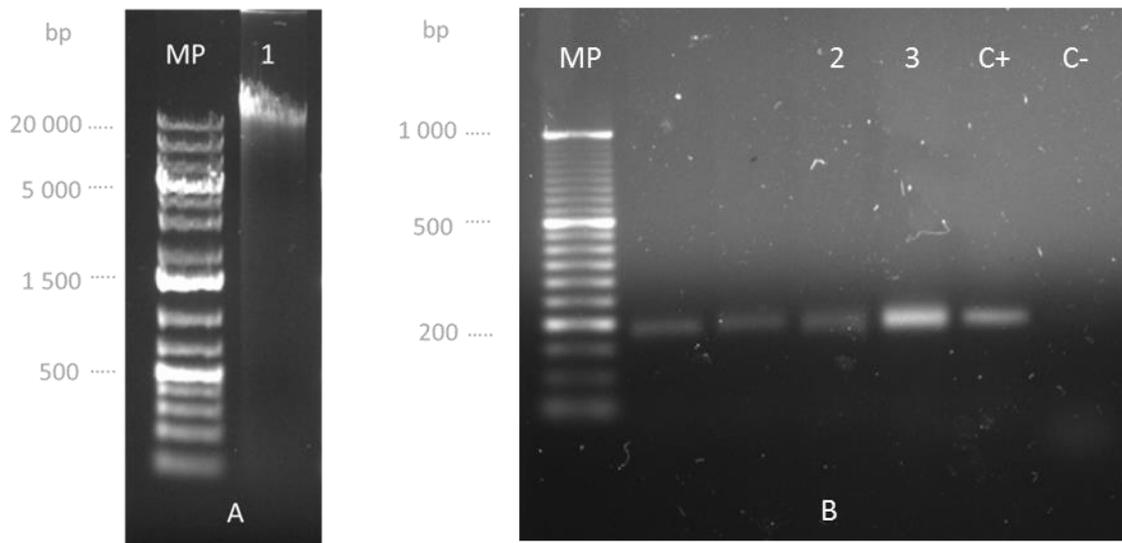


Figura No. 13. ADN metagenómico de la microbiota del queso Cotija extraído con PCI. Panel A) MP- Marcador de tamaño molecular GeneRuler 1Kb Plus *Thermo Scientific*. 1- ADN metagenómico extraído por el método PCI. Panel B) MP- Marcador de tamaño molecular O' Range Ruler™ 50 pb DNA Ladder, *Thermo Scientific*. 2) Producto de PCR del gen ribosomal 16S a partir del ADN metagenómico extraído. 3) Producto de PCR del gen ribosomal 16S a partir del ADN metagenómico extraído adicionando un paso de purificación del ADN por columna. C+) Control positivo de la reacción. C-) control negativo de la reacción.

Además de la integridad y la calidad amplificable del ADN, otro criterio importante para la elección del método de extracción de ácidos nucleicos en estudios metagenómicos es el rendimiento del material obtenido. En la tabla No. 14 se presenta el resumen de estos datos y la comparación entre ambas metodologías. El ADN obtenido proveniente de 75 g de queso Cotija independientemente del protocolo utilizado. Sin embargo, el rendimiento expresado como porcentaje de mg de ADN/mg células extraídas del queso, es mayor cuando se utiliza la metodología con PCI-QIAquick. La diferencia de rendimientos posiblemente radica en que el método con PCI implica tratamientos enzimáticos más drásticos para la ruptura celular. Cabe mencionar, que Escobar-Zepeda propuso utilizar la acción conjunta de la lisozima y la mutanolisina para mejorar la representatividad de la diversidad microbiana (Escobar-Zepeda A., En revisión; Yuan S., *et al.*, 2012). La concentración y el volumen de ADN obtenido por esta metodología son suficientes para las etapas posteriores.

A pesar de que el kit Fast ID ha sido utilizado desde hace varios años en el grupo de trabajo y ha demostrado ser un protocolo que permite la extracción de ADN en cantidad y pureza suficiente para todo tipo de ensayos, la concentración de ADN extraído es 5 veces menor a la mínima requerida en los siguientes pasos de este proyecto. Esto implica un paso adicional de concentración donde puede perderse o degradarse el ADN metagenómico. La pureza de los ácidos nucleicos medida como la relación A_{260nm}/A_{280nm} es adecuada independientemente del método de extracción de ADN utilizado.

Con base en estos resultados, se infiere que el protocolo con PCI-QIAquick resultó más eficiente para la extracción del ADN metagenómico en este proyecto. Esto significa la superación de un paso fundamental en la elaboración de la biblioteca metagenómica.

Tabla No. 14. Comparación de los datos de extracción de ADN metagenómico obtenidos por dos metodologías diferentes. Para ambas metodologías se usaron 75 g de Queso Cotija.

Metodología empleada	Kit Fast ID	Extracción con PCI-QIAquick
Concentración de ADN (ng/μL)	30	200
Volumen (μL)	540	250
Relación A_{260nm}/A_{280nm}	2.1	2.06
ADN total (μg)	16.61	50.47
Rendimiento= $\left(\frac{\text{mg ADN}}{\text{mg de paquete celular}}\right) \times 100$	0.017 %	0.060 %

7.2. Fragmentación del ADN

El ADN metagenómico purificado con PCI-QIAquick, se sometió a ensayos de digestión enzimática para generar fragmentos de longitud entre 5-12 kpb que tuvieran sitios de reconocimiento compatibles con el vector ZAP Express para su posterior ligación. Se utilizaron las enzimas *Sau3AI* y *BamHI* (*Promega*) a diversas condiciones de tiempo de digestión y concentración de enzima.

Las condiciones probadas y el resumen de resultados con la enzima *Sau3AI* se presenta en la Tabla No. 15. Las digestiones realizadas con 0.1, 0.2 y 0.3 U en 20 μL de reacción durante 30 min, resultaron en digestiones excesivas debido a que se obtienen fragmentos menores a 5 kpb (Figura No. 15 Panel A, carril 1, 2 y 3). Con base en estos resultados se probaron concentraciones de enzima y tiempo menores, entre ellos, 0.1 U y 0.01 U en un intervalo de 10 a 30 min. La reacción que se llevó a cabo con 0.1 U resultó en un patrón de fragmentación donde la mayor población de fragmentos se observan entre 700 – 5,000 pb (Figura No. 14 Panel B, carril 4 y 5). Por otra parte, el uso de 0.01 U de enzima es insuficiente para hidrolizar el ADN metagenómico (Figura No. 14 Panel B, carril 6 y 7). Las digestiones realizadas con 0.015 y 0.020 U generaron baja concentración de fragmentos en la zona de interés (Figura No. 14 Panel C, carril 8 y 9). A pesar de trabajar con concentraciones tan bajas de enzima *Sau3AI*, no se lograron optimizar las condiciones de digestión para obtener buenos rendimientos de ADN digerido en la zona de 5-12 kpb, por lo que se probó con la enzima *BamHI*.

Figura No. 14. Electroforesis de las condiciones de digestión de ADN metagenómico con la enzima *Sau3AI*. MP) Marcador de tamaño molecular GeneRuler 1 Kb Plus *Thermo Scientific*. B) Blanco de reacción. Agarosa 0.7 % (p/v), buffer TAE, 90 V, 40 min.

Algunas de las condiciones probadas y los perfiles de digestión con la enzima *Bam*HI se muestran en la Tabla No.16 y en la Figura No. 15, respectivamente.

Tabla No. 16. Resumen de condiciones de ensayos enzimáticos llevados a cabo con la enzima *Bam*HI. *Se utilizaron 400 ng de ADN, 0.1 mg/mL ABS, Buffer MULTI CORE™ 1X. Las reacciones se inactivaron a 65 °C por 15 min.

Digestión realizadas con enzima <i>Bam</i> HI		
Unidades de enzima en 20 µL de reacción.	Tiempo de digestión a 37 °C (min).	Resultado
2U	40, 60	Excesiva
3U	30, 40,60	Excesiva
2U	15, 30	Población de fragmentos en 5 kpb.
3U	10, 20	Población de fragmentos mayor a 5 kpb.

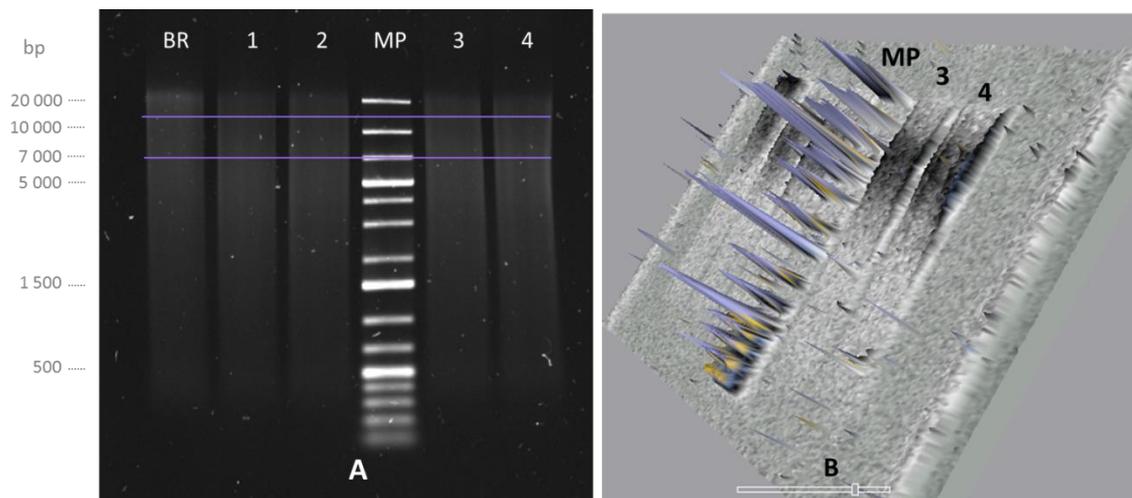


Figura No. 15. Digestiones realizadas con la enzima *Bam*HI. Panel A- Electroforesis de digestiones con *Bam*HI. Panel B- Imagen 3D de las digestiones con *Bam*HI, *Image Lab 3.0*. MP) Marcador de tamaño molecular GeneRuler 1Kb Plus *Thermo Scientific*. BR) Blanco de reacción. 1) Digestión realizada con 2 U de *Bam*HI durante 15 min. 2) Digestión realizada con 2 U de *Bam*HI durante 30 min. 3) Digestión realizada con 3 U de *Bam*HI durante 10 min. 4) Digestión realizada con 3 U de *Bam*HI durante 20 min. Gel de agarosa estándar 0.7 % (p/v), buffer TAE, 90 V, 40 min.

A partir de la electroforesis mostrada en la Figura No 15 panel A, se realizó un análisis densitométrico con el programa *Image Lab 3.0* para poder elegir la condición de digestión más adecuada. El análisis consistió en cuantificar la intensidad de cada carril en dos regiones: de 12 kpb-5 kpb y de 5 kpb-3 kpb. Los resultados mostraron que al utilizar 3 U de *Bam*HI (Figura No 15 carril

3 y 4) se genera mayor cantidad de fragmentos superiores a 5 kpb en comparación con el uso de 2 U (Figura No 15 carril 1 y 2). Por otra parte, cuando la digestión dura 20 min/ 3 U se genera mayor cantidad de fragmentos mayores a 5 kpb comparada con la digestión durante 10 min/ 3 U (Figura No. 15, Panel B). Por esta razón, se estableció que la condición apropiada para fragmentar 400 ng de ADN es utilizando 3 U de enzima *Bam*HI durante 20 min a 37 °C. Las condiciones de digestión finales se muestran en la Tabla No. 17.

Tabla No. 17. Condiciones finales de digestión del ADN metagenómico.

Reactivo	Concentración inicial del reactivo	Concentración final del reactivo	Volumen adicionado al BLANCO (μL)	Volumen adicionado a la reacción con 3 U <i>Bam</i> HI
Agua grado biología molecular	-	-	c.b.p. 20 μL	c.b.p. 20 μL
Buffer de enzima MULTI-CORE™	10 X	1 X	2	2
ABS	1 mg/mL (10X)	0.1mg/mL(1X)	2	2
ADN		(400 ng totales)	-	c.b.p. 400 ng
Enzima (<i>Bam</i> HI)	1 U/μL	0.15 U/μL	-	3
Volumen total	-	-	20	20

7.3. Purificación de fragmentos

Una vez optimizadas las condiciones de digestión del ADN metagenómico, se probaron 4 metodologías diferentes para purificar los fragmentos de 5 a 12 kpb, provenientes de 16 μg de ADN metagenómico digerido. El objetivo fue conseguir ADN fragmentado en cantidad y calidad suficiente para ser ligado con el vector. Las especificaciones del vector ZAP Express indica que se requiere un volumen máximo de 2.5 μL de ADN de concentración adecuada para cumplir la relación molar deseada entre el ADN inserto y el vector. Para este sistema se recomienda probar relaciones molares (inserto: vector) desde 0.25:1 a 8:1 (Sambrook J., *et al.*, 2001). Las metodologías evaluadas fueron (Tabla No. 18):

- Protocolo del Kit High Pure PCR Product Purification *Roche*.
- Protocolo del kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery *Zymoreserch*.
- Protocolo que utiliza tierra de diatomeas.
- Protocolo de QIAEX II *QIAGEN*/ DNA clean & concentrator *BIOSIS*.

El kit High Pure PCR Product Purification *Roche* permite la purificación de fragmentos de ADN mayores a 100 pb, sin embargo, no menciona la máxima longitud de ADN que puede recolectar. De

acuerdo a los resultados obtenidos, concluimos que el rendimiento de purificación de fragmentos de alto peso molecular fue muy bajo. Los fragmentos de ADN purificados se recuperan sin ser degradados en el proceso. Sin embargo, no tiene la pureza necesaria, ni la cantidad suficiente (nanogramos totales) para realizar la reacción de ligación (Figura No. 16. carril 1).

El kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery *Zymoresearch* posee una columna de purificación de ADN con un diámetro de 2.0 mm permitiendo eluir el ADN en un volumen $\geq 6\mu\text{L}$ de agua, cabe mencionar, que el kit ofrece un porcentaje de recuperación del 50 %-70 % para fragmentos de ADN entre 11-23 kpb. Experimentalmente, se lograron obtener 8 μL de fragmentos de ADN con una concentración de 45 ng/ μL aproximadamente y fueron visualizados en gel de agarosa. En la Figura No. 16. carril 2 puede observarse que los fragmentos no se encuentran en el rango de tamaños moleculares deseados, por lo que esta metodología no resultó viable para el proyecto.

Tabla No. 18. Resumen de resultados obtenidos al purificar fragmentos de ADN a partir de agarosa con diferentes metodologías.

No gel.	Método utilizado	Concentración (ng/ μL)	Relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	Cantidad (μL)	Observaciones
1	High Pure PCR Product Purification <i>Roche</i>	18.0	1.29	9	No puede concentrarse
2	Zymoclean™ <i>Zymoresearch</i>	45	1.9	8	Degradado
3	Tierra de diatomeas	93.45	6.57	30	Contaminado
4	QIAEX II <i>QIAgen</i>	44.81	1.6	8	Contaminado con sales/sílice.
5	QIAEX II <i>QIAgen</i> / DNA Clean & Concentrator-5 <i>BIOSIS</i> .	213.78	1.98	7	✓ Adecuado

La tercera opción probada utiliza tierra de diatomeas como una matriz de unión de ácidos nucleicos. Se ha reportado que la tierra de diatomeas está recubierta con un compuesto gelatinoso que resulta inhibitorio en reacciones de PCR, secuenciación, clonación, etc. (Kim K-S., *et al*, 1996; Tanaka J., *et al.*, 2002), por lo que se realizó un blanco de agua a la par de la reacción de purificación y al final del proceso se midió la cantidad de ADN tanto en el blanco como en la muestra por absorbancia a 260 nm. Los resultados mostraron que el agua recuperada tenía una concentración de 28.83 ng/ μL , lo que pone de manifiesto la posible contaminación del ADN purificado. Los fragmentos de ADN se recuperaron en un volumen aproximado de 30 μL con una concentración de 93.45 ng/ μL y una relación de $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ de 6.58, lo que era de esperarse. Pese a la relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, el rendimiento alcanzado es bastante favorable y pudo visualizarse en una electroforesis en el rango de tamaños deseados (Figura No. 16. carril 3). Dado que, eliminar la contaminación existente en los fragmentos recuperados implica pérdida de ADN, esta metodología tampoco resultó una opción viable.

La cuarta opción probada fue el kit QIAEX II *QIAGEN* que permite recuperar fragmentos de hasta 50 kpb en un volumen aproximado de 18 μL con una eficiencia del 70 %. Los resultados logrados después de concentrar fueron 8 μL de concentración 44.81 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Además, los fragmentos se visualizaron en gel de agarosa de manera intensa en los tamaños esperados (Figura No. 16, carril 4). Sin embargo, la solución de ADN tiene una apariencia amarillenta y viscosa, esto puede deberse a que contenga sales y colorantes de los buffer así como sílice. Todos estos componentes pueden interferir en reacción posteriores. Por lo que a esta metodología se agregó un paso de purificación y concentración con el kit DNA Clean & concentrator- 5 *BIOSIS* (Figura No. 16, carril 5). De esta manera, se lograron obtener 7 μL de fragmentos de ADN de concentración 213 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y una relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ de 1.98. Los fragmentos fueron observados como un barrido intenso de ADN desde 10 kpb hasta 1.5 kpb.

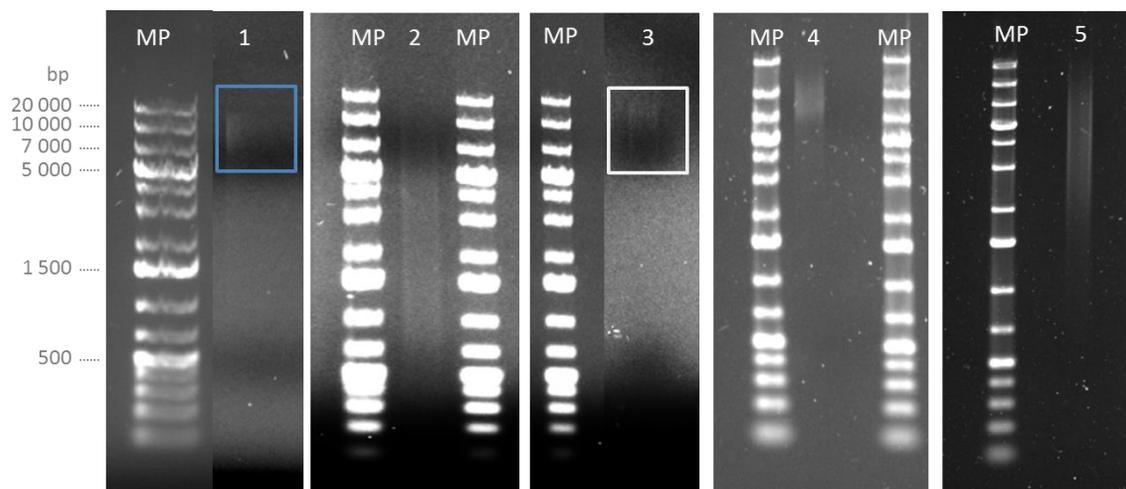


Figura No. 16. Fragmentos de ADN purificados. (MP) Marcador de tamaño molecular GeneRuler 1 kpb Plus *Thermo Scientific*. 1) ADN purificado con kit High Pure PCR Product Purification *Roche*. 2) ADN purificado con kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery *Zymoresearch*. 3) ADN purificado con tierra de diatomeas. 4) ADN purificado con el kit QIAEX II de *QIAGEN*. 5) ADN purificado con el kit QIAEX II de *QIAGEN*/ DNA Clean & concentrator-5 *BIOSIS*. Agarosa 1 % (p/v), Buffer TAE, 90 V, 40 min.

En resumen, el uso conjunto del kit QIAEX II *QIAGEN* y el kit DNA Clean & Concentrator-5 *BIOSIS* posibilitaron la purificación de fragmentos de alto peso molecular en cantidad y concentración adecuada para la reacción de ligación con el vector ZAP Express.

7.4. Elaboración de la biblioteca metagenómica

Como se mencionó anteriormente, la relación molar inserto: vector sugerida en reacciones de ligación con el bacteriófago λ varían desde 0.25:1 hasta 8:1 (inserto: vector) (Sambrook J., *et al.*, 2001). Esta relación molar impacta directamente en el número de recombinantes resultantes. La relación molar aproximada para esta biblioteca metagenómica fue de 3.4:1 (inserto: vector) considerando un tamaño promedio de inserto de 6 kpb. Esto representaba una alta probabilidad de ligación entre el vector y los fragmentos generados.

$$ng \text{ ADN inserto} = \frac{(\text{Tamaño de inserto kpb})(ng \text{ vector})}{(\text{Tamaño del vector kpb})} \frac{(\text{cantidad de inserto})}{(\text{cantidad de vector})}$$

$$\text{Donde: } \frac{\text{cantidad de inserto}}{\text{cantidad de vector}} = \text{relación molar}$$

$$\text{relación molar} = \frac{(530 \text{ ng inserto})(38.9 \text{ kpb})}{(1000 \text{ ng vector})(6 \text{ kpb})} = \frac{3.4}{1}$$

Los productos de la amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa estándar. Los amplicones generados se aprecian como un barrido desde los 20 kpb hasta 500 pb (Figura No.17). Con base en estos resultados podemos inferir que los fragmentos generados del ADN metagenómico del queso Cotija se ligaron con el vector ZAP Express con éxito.

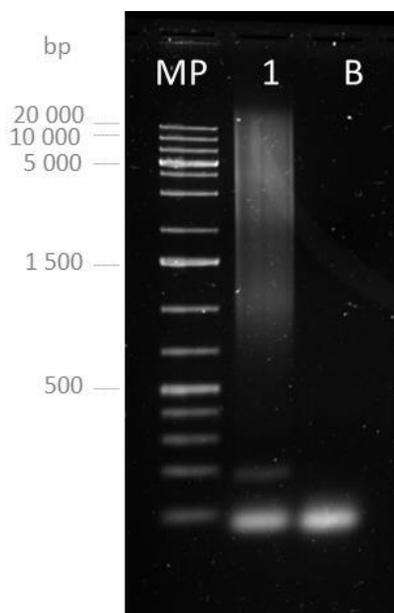


Figura No. 17. Electroforesis del producto de amplificación de Lig-PCR. MP- Marcador de tamaño molecular GeneRuler 1 kb Plus *Thermo Scientific*. 1) Producto de Lig- PCR. B) Blanco de reacción. Agarosa 0.7 % (p/v), 90 V, 40 min.

7.5. Titulación de la biblioteca metagenómica

La titulación se realiza con el objetivo de cuantificar el número de clonas obtenidos por mililitro de la biblioteca metagenómica. En el caso de los virus bacterianos líticos, la titulación se realiza asumiendo que cada unidad infectiva es capaz de producir una placa de lisis sobre un césped bacteriano, lo que es cierto para bajas multiplicidades de infección. Por tanto, al determinar el número de UFP producidas al infectar varias diluciones de la biblioteca metagenómica, se puede

calcular el número de unidades infectivas existentes por cada mL. Por consiguiente, se realizó la titulación por duplicado de la biblioteca metagenómica recién construida y los resultados se muestran a continuación (Tabla No. 19):

Tabla No. 19. Titulación de la biblioteca metagenómica generada. Resultados de la infección de 200 μ L de células con 2 μ L de cada dilución de la biblioteca metagenómica de Queso Cotija.

Dilución \ Serie	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	Control -
Serie 1	45 UFP	9 UFP	1 UFP	0 UFP	Tapete de células
Serie 2	65 UFP	5 UFP	1 UFP	0 UFP	Tapete de células

La biblioteca metagenómica del queso Cotija generada tiene 136 950 clonas con un título de 275 UFP/ μ L (Anexo 11.22). El banco metagenómico representa 0.821 Gpb de metagenoma si consideramos que el tamaño promedio de los fragmentos clonados fue de 6 kpb. El tamaño promedio de los fragmentos fue calculado tomando en cuenta fragmentos desde 700 pb -12 kpb con base en la electroforesis de la reacción de ligación (Figura No.17).

Considerando que el tamaño de los genes reportados codificante para enzimas esterases carboxílicas tiene un tamaño entre 700 - 2500 pb, es probable que los insertos clonados contengan un gen completo (Henne, A., *et al.*, 2000; Ranjan R., *et al.*, 2005; Yun-Jung K., *et al.*, 2006.; Roh C. y Villatte F., 2008; Wu C. y Sun B., 2009; Zhang T., *et al.*, 2009; Jiang X., *et al.*, 2012; Khan M., *et al.*, 2013).

Por otro lado, el tamaño de la biblioteca metagenómica obtenida es comparable con las reportadas tanto para el mismo sistema de clonación como para otros sistemas como plásmidos y fósmodos, que van desde los 350 Mpb - 1.1 Gpb (Tabla No. 20).

7.6. Amplificación de la biblioteca metagenómica

La biblioteca obtenida fue amplificada para aumentar la probabilidad de encontrar las enzimas de interés, así como, para conservarla y que sirva como punto de partida de otras investigaciones. La biblioteca metagenómica se amplificó a un título de 2.21×10^5 UFP/ μ L de biblioteca y un volumen final de 20.5 mL que fue almacenado a -70 °C en criotubos de 1.5 mL.

Tabla No. 20. Bibliotecas metagenómicas construidas con diferentes vectores.

Muestra ambiental	Tipo de vector	Tamaño de insertos	Tamaño de biblioteca	Referencia
Rumen bovino	Fago λ ZAP Express vector	0-12 kb	1100 Mb	Ferrer M., <i>et al.</i> , 2005
Pozol	Fago λ ZAP Express vector	5-6 kb	112 Mb	Peña García G. C., 2011
Suelo del desierto antártico	Fósmido	30 kb	300 Mb	Heath, C., <i>et al.</i> , 2009
Agua de río	Fósmidos pCC1FOS	25-45 kb	714 Mb	Ouyang L-M., <i>et al.</i> , 2013
Suelo	Plásmido pUC19	2.5 kb	48.75 Mb	Ouyang L-M., <i>et al.</i> , 2013
Suelo	Plásmido pJAZZ	1-3 kb	6 Mb	Khan M., <i>et al.</i> , 2013
Sedimentos de aguas profundas del océano pacífico	Fósmido pCC2FOS	36 kb	\leq 720 Mb	Jiang X., <i>et al.</i> , 2012
Queso Cotija "Región de origen"	Fago λ ZAP Express vector	0.7 -12 kpb	821 Mb	En este trabajo

7.7. Búsqueda de actividad esterasa en la biblioteca metagenómica

Para poder iniciar la búsqueda de clonas positivas en la biblioteca metagenómica, se validó la técnica mediante controles. Como control positivo se utilizó una cepa recombinante de *E. coli* que posee una enzima con actividad esterasa proveniente de *Bacillus pumilus* GMA1 (cepa *E. coli* pETYkuU 11), como control negativo se utilizó la cepa de *E. coli* XL1-Blue (Figura No. 18). La cepa control positivo se torna notablemente mucho más oscura que la cepa control negativo al reaccionar con el sustrato durante el mismo tiempo, esto significa que la técnica de búsqueda es óptima.

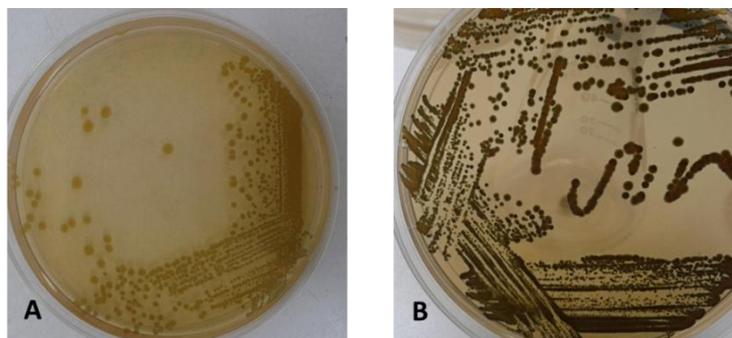


Figura No. 18. Controles de búsqueda de CEH en la biblioteca metagenómica. A. Control negativo con *E. coli* XL1-Blue. B. Control positivo con *E. coli* pETYkuU 11 (Cepa recombinante con actividad esterasa proveniente de *Bacillus pumilus* GMA1). Reacción realizada con α -naftil acetato y Fast blue RR.

Posteriormente, se inició la búsqueda de enzimas CEH en el banco metagenómico. Se analizaron aproximadamente 115 000 fagos de la biblioteca metagenómica de los cuales 13 UFP se revelaron como fagos presuntamente positivos (Figura No. 19, Panel A).

El número de clonas analizadas es relativamente alto comparado con algunas bibliotecas metagenómicas en plásmido y otros sistemas de expresión (Tabla No. 21), esto puede deberse a la excesiva amplificación que se realizó de las clonas. Durante la etapa de amplificación cada una de las clonas obtenidas se replica para aumentar la cantidad de cada una de ellas, esto puede aumentar la probabilidad de encontrar el gen de interés durante la búsqueda funcional o por el contrario, puede reducir la tasa de éxito de encontrar al gen diana.

Tabla No. 21. Relación de clonas positivas encontradas y las clonas analizadas en una biblioteca metagenómica. (*Enzimas lipolíticas putativas y/o que presuntivamente pertenecen a bacterias no cultivables).

Muestra ambiental	Tipo de vector	Método de identificación	Clonas positivas/clonas analizadas	Referencia
Rumen bovino	Fago λ ZAP Express vector	Fast Blue RR α -naftil acetato	12/14 000	Ferrer M., <i>et al.</i> , 2005
Suelos de playas, pisos, bosques	Fósmidos pCC1FOS	Fast Blue RR α -naftil acetato (<i>Escherichia coli</i>)	5*/60 000 *(1)	Kim Y., <i>et al.</i> , 2006
Fuente termal	Plásmido pZErO-2	Agar con tributirina y trioleína + rodamina B	2/36 000	Tirawongsaroj P., <i>et al.</i> , 2008
Lodos activados	Plásmido	Agar con tributirina	1/100 000	Roh C. y Villatte F., 2008
suelo del desierto antártico	Fósmido	Agar con tributirina	1/10 000	Heath C., <i>et al.</i> , 2009
Lodos activados	Fósmido	Agar con tributirina	1/100 000	Zhang, T., <i>et al.</i> , 2009
Agua de río	Fósmidos pCC1FOS	Agar con tributirina	6*/20 400 *(1)	Ouyang L-M., <i>et al.</i> , 2013
Suelo	Plásmido pUC19	Agar con tributirina	1/19 500	Ouyang L-M., <i>et al.</i> , 2013
Suelo	Plásmido pJAZZ	Agar con rojo fenol y aceite de oliva Agar con rodamina y aceite de oliva	2*/2000	Khan M., <i>et al.</i> , 2013
Sedimentos de aguas profundas del océano pacífico	Fósmido pCC2FOS	Agar con tributirina	9*/20 000 *(8)	Jiang X., <i>et al.</i> , 2012
Prado cerca de Northeim, un campo de remolacha azucarera (Alemania) y el valle del río Niemen.	Plásmido pBluescript SK(+)	Agar con trioleína	1/730,000	Henne A., <i>et al.</i> , 2000
	Plásmido pBluescript SK(+)	Agar con tributirina	3/280 000	Henne A., <i>et al.</i> , 2000

La siguiente etapa fue realizar la escisión *in vitro* del vector pBK-CMV que contiene el fragmento de ADN metagenómico que codifica para alguna enzima con la capacidad de hidrolizar α -naftil acetato. La escisión *in vivo* es un paso de subclonación del ADN insertado en el fago λ y generar un fagémido pBK-CMV, para facilitar su manipulación en pasos subsecuentes. La escisión es necesaria para la expresión en la bacteria *E. coli* XLOLR de los genes contenidos en los fragmentos del metagenoma. Por lo tanto, después de la escisión del vector y de la transducción de *E. coli* XLOLR, cada clona fue sembrada en placas de agar LB + tributirina (1 % v/v) + IPTG (0.4 mM) + kan (50 μ g/mL) y se incubaron a 37 °C por 7 días. Pasado este tiempo algunas de las colonias sembradas presentaron un halo claro alrededor que representa la hidrólisis de la tributirina del medio de cultivo (Figura No. 19, Panel B). Esas clonas se resembraron en placas de agar con la misma composición y bajo las mismas condiciones para ratificar que tenían la capacidad de hidrolizar ácidos grasos (Figura No. 19, Panel C). Todas las colonias aisladas volvieron a hidrolizar la tributirina del medio esto quiere decir que las clonas seleccionadas mantienen la actividad hidrolítica. Las clonas aisladas fueron nombradas por letra como (Hidrolasa de la Biblioteca Metagenómica del queso Cotija): HBMqC-A, HBMqC-B, HBMqC-C, HBMqC-D, HBMqC-E, HBMqC-F, HBMqC-G, HBMqC-H, HBMqC-I, HBMqC-J, HBMqC-K, HBMqC-L, HBMqC-M.

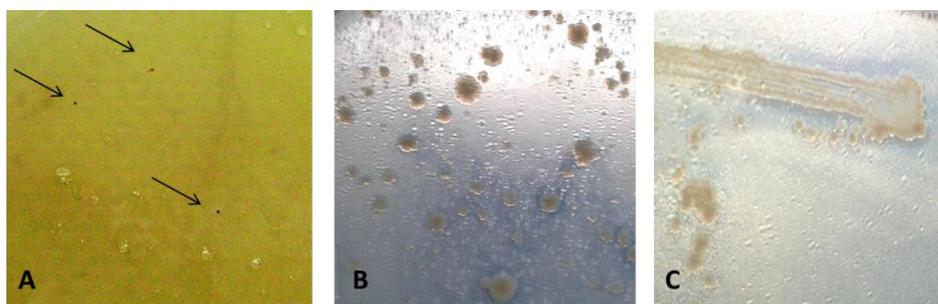


Figura No. 19. Búsqueda de UFP CEH positivas y confirmación. A. Ejemplo de placas de infección con α -naftil acetato y Fast Blue RR para búsqueda de enzimas CEH. B Confirmación de clonas en medio LB + tributirina (1 % (v/v)) + IPTG (0.4 mM) + kan (50 μ g/mL) incubadas a 37 °C por 7 días. C. Reconfirmación de clonas seleccionadas bajo las mismas condiciones.

7.8. Evaluación cualitativa de la actividad enzimática en microplaca

Se estimó de manera cualitativa la actividad hidrolítica tanto del contenido intracelular como del extracto extracelular de cada clona en microplaca. Se utilizó como sustrato acetato de α -naftilo y como revelador Fast Red. Durante el ensayo se utilizaron las cepas *E. coli* XL1-Blue y *E. coli* XLOLR como controles negativos. Los resultados muestran que la actividad enzimática se encuentra en el contenido intracelular, esto era de esperarse ya que el plásmido no cuenta con señales para la excreción de proteínas (Figura No. 20). El hecho de que la actividad hidrolítica se presente intracelularmente explica que los halos de hidrólisis observados en las placas de agar LB + tributirina sean pequeños. Quizás, la actividad observada en ese ensayo sea el resultado de una ligera permeación de las proteínas expresadas intracelularmente.

Al comparar los resultados de la actividad de los contenidos intracelulares se observa que hay diferencia en el nivel de actividad de las clonas. Las clonas A, C, F, G, H e I tienen actividad sobresaliente respecto a las otras clonas (extractos observados con un color marrón intenso).

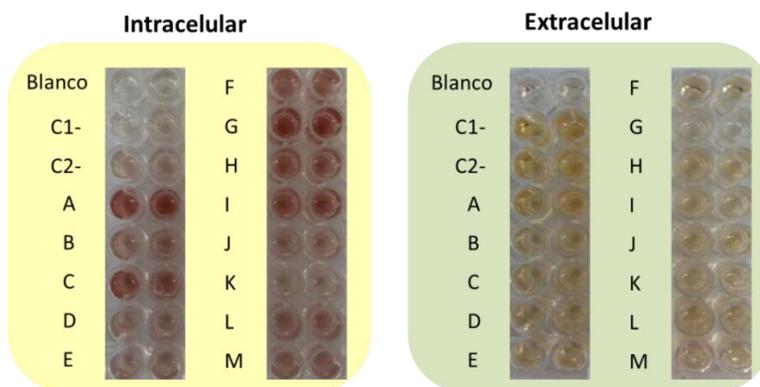


Figura No. 20. Actividad hidrolítica intra y extracelular evaluada con acetato de α -naftilo y Fast red. Todas las muestras fueron ajustadas a la misma concentración de proteína, los ensayos se realizaron por duplicado, el tiempo de reacción fue de 15 min. Blanco. Buffer de fosfatos 50 mM. C1-. Control negativo *E. coli* XL0LR. C2-. Control negativo *E. coli* XL1-Blue. A-M. Identificador de la clona evaluada.

7.9. Secuenciación de insertos

Se secuenciaron los insertos de las clonas A, C, F, G, H e I que fueron las que presentaron actividad hidrolítica sobresaliente en el ensayo cualitativo en microplaca. Para esto, se realizó la extracción y purificación del plásmido pBK-CVM recombinante de cada clona y se obtuvo la secuencia de nucleótidos por el servicio Primer Walking, *Macrogen* (Humanizing Genomics Macrogen, 2015). Para corroborar los resultados del servicio, la clona I fue secuenciada en el laboratorio a la par con diseño de cebadores y secuenciaciones hasta completar el 100 % del fragmento de ADN insertado en el vector. El ensamble de secuencias se realizó mediante alineamientos de los contigs. Las secuencias obtenidas están disponibles en el laboratorio 312, Facultad de Química, UNAM. En el anexo 11.23 se muestra un electroferograma como evidencia de la calidad de la secuenciación.

La secuencia recibida del servicio de secuenciación Primer Walking para la clona I y la obtenida y ensamblada con diseño de cebadores, no presentan diferencias (Anexo 11.24). Sin embargo, al realizar los ensambles de los contigs recibidos para cada clona y compararlos con la secuencia completa entregadas por *Macrogen*, en la secuencia HBMqC-H se encontró la inserción de una guanina entre la base 1883 y 1884. Esta inserción está contenida en una secuencia codificante, no obstante, al realizar la anotación de los distintos ORF predichos con la inserción y sin ella, no hubo diferencias.

Se realizaron alineamientos pareados tanto globales como locales para corroborar que todas las secuencias en estudio fueran diferentes o no se encontraran incluidas en otra secuencia. Los alineamientos realizados indicaron con base en los porcentajes de identidad y similitud, que los fragmentos de ADN insertados en el plásmido pBK-CMV son diferentes entre sí (Anexo 11.25).

Las secuencias insertadas en las clonas seleccionadas tienen un tamaño de 2704 pb hasta 6123 pb, esto coincide con el barrido de tamaños moleculares observados en la electroforesis del PCR control de la reacción de ligación. El tamaño de los insertos es suficiente para contener marcos de lectura cortos, genes que codifican para proteínas de dominio único, genes que codifican para proteínas multidominio y operones cortos (Wooley J. C., *et al*, 2010).

En cada secuencia se realizó la predicción de marcos abiertos de lectura (ORF), en la Tabla No. 22 se muestra un resumen de las características de los ORF predichos de cada clona.

Tabla No. 22. Marcos abiertos de lectura predichos en las secuencias de las clonas aisladas.

Clona	ORF predicho (pb)	Longitud en aa	Marco de lectura
HBMqC-A	A1:1-1107	368	+1
	A2: 1153-1689	178	+1
	A3: 1738-2538	266	-1
	A4: 252-2677	41	-1
HBMqC-C	C1:2-499	165	+1
	C2:667-993	108	-1
	C3:1012-1311	99	-1
	C4:1404-2324	306	+1
	C5:2763-3188	141	-1
	C6:4017-4382	121	+1
	C7:4583-5800	405	+1
HBMqC-F	F1:3-239	78	+1
	F2:474-1037	187	+1
	F3:1167-1610	147	+1
	F4:1880-2314	144	+1
	F5:2809-3102	97	+1
	F6:3255-3917	221	+1
HBMqC-G	G1:1-252	83	+1
	G2: 342-1340	332	-1
	G3:1343-2374	343	-1
	G4:2379-2585	68	-1
HBMqC-H	H1:1-495	165	-1
	H2:680-1972	430	+1
	H3:2064-2987	307	+1
	H4:3469-3624	51	-1
HBMqC-I	I1: 1900-2136	78	-1

Se marca con color gris los ORFs seleccionados como los más probables.

Por otra parte, los ORF fueron alineados contra la base de datos no redundante del NCBI mediante el programa BLASTp. Adicionalmente, se buscaron motivos proteínicos en cada ORF con el programa ProSite y se alinearon contra la base de datos Lipase Engineering. Para poder hacer la anotación y predicción funcional consensada de cada gen, se realizaron los alineamientos de las secuencias nucleotídicas en la base de datos UniProt. Se tomaron en cuenta los resultados más significativos con base en los parámetros: porcentaje de cobertura, porcentaje de identidad y valor de expectativa. Los resultados de los ORF más significativos predichos para cada clona y sus respectivas anotaciones se presentan en la Tabla No. 23.

Los ORF A1 y A3 codificados en la clona HBMqC-A y el C4 contenido en la clona HBMqC-C alinearon en las bases de datos para enzimas del tipo oxidoreductasas. Las oxidoreductasas son enzimas que catalizan la transferencia de electrones de una molécula (el oxidante) a otra molécula (el reductor) y pueden clasificarse de manera muy resumida en oxidasas, peroxidasas, hidroxilasas, oxigenasas, reductasas y deshidrogenasas (NC-IUBMB, 2015).

Tabla No. 23. Anotación de marcos de lectura abiertos (ORF) predichos en las clonas hidrolasa positivos aislados de la biblioteca metagenómica del queso Cotija. Para cada ORF predicho se asignó un nombre (letra de la clona-número).

Clona/ tamaño de inserto	ORF predicho (pb)	Longitud de la proteína	Valor esperado (e)	Porcentaje de identidad (aa)	Porcentaje de cobertura (aa)	Proteína con la que presenta mayor similitud	Organismo de procedencia probable	Comentarios
HBMqC-A 2820 pb 67% GC	A1:1-1107 (directa)	368 aa	0.0	99 %	100 %	Reductasa, ferredoxina	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	Motivo –Ala-Xaa ₁ -Ser-Xaa ₂ -Gly- lipasas de Gram ⁺ , LED.
	A3: 2538- 1738 (reversa)	266 aa	0.0	99 %	100 %	Oxidorreductasa, Deshidrogenasa de cadena corta	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	LED
HBMqC-C 6123 pb 65% GC	C4: 1404-2324 (directa)	306 aa	1e ⁻¹⁴⁹	73 %	100 %	Oxidorreductasa putativa	<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	LED
	C5: 3188-2763 (reversa)	141 aa	2e ⁻⁷⁸	88 %	97 %	Proteína hipotética	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	-
	C7: 4583-5800 (directa)	405 aa	0.0	100 %	100 %	Proteína de la familia de la integrasa	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	-
HBMqC-F 4037 pb 65% GC	*F5: 2809-3102 (directa)	97 aa	2e ⁻¹⁷	52 %	98 %	Proteína hipotética	<i>Corynebacterium variabile</i>	-
	F6: 3255-3917 (directa)	221 aa	1e ⁻⁸¹	82 %	76 %	Trasportador de hierro tipo ABC	<i>Corynebacterium glyciniphilum</i>	Motivo –Gly-Xaa ₁ -Ser-Xaa ₂ -Gly-
HBMqC-G 2704 pb 68% GC	G2: 1340-342 (reversa)	332 aa	4e ⁻¹⁴⁸	61 %	95 %	Trasportador glicina/betaína tipo ABC	<i>Curtobacterium sp.</i>	-
	G3: 2374-1343 (reversa)	343 aa	2e ⁻¹⁶⁰	65 %	95 %	Trasportador glicina/betaína tipo ABC	<i>Curtobacterium sp.</i>	Motivo –Ser-Xaa ₁ -Xaa ₂ -Lys-
	*G4: 2585-2379 (reversa)	68 aa	4e ⁻²⁵	81 %	100 %	Proteína hipotética	<i>Kocuria rhizophila</i>	-
HBMqC-H 3642 pb 72% GC	H2: 680-1972 (directa)	430 aa	0.0	71 %	99 %	Fosforibosilamino-glicina ligasa	<i>Kocuria marina</i>	-
	H3: 2064-2987 (directa)	307 aa	2e ⁻¹⁴⁶	68 %	98 %	Fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintasa	<i>Kocuria rhizophila</i>	-
HBMqC-I 3341 pb 50% GC	I1:2136-1900 (reversa)	78 aa	3e ⁻⁴⁷	99 %	100 %	Proteína hipotética	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-

LED-La secuencia tuvo algún hit en la base de datos Lipase Engineering (Fischer M. y Pleiss J., 2003). *- No predichos por UniProt.

Se ha reportado que este tipo de enzimas son capaces de catalizar reacciones alternativas que difieren de su reacción fisiológica natural. Por ejemplo, la isocitrato deshidrogenasa de *Zymomonas mobilis* es capaz de hidrolizar sustratos *p*-nitrofenil o la peroxiredoxina de *Bacillus pumilus* que es capaz de hidrolizar acetato de α -naftilo, entre otros ejemplos (Nevalainen T., 2010; Salazar C., 2013; Arora B., *et al.*, 2014; Copley S., 2015). Esta capacidad que exhiben las enzimas de realizar transformaciones químicas diferentes al tipo de reacción que corresponde a su clasificación, se le ha denominado, promiscuidad. Las funciones promiscuas son accidentales desde el punto de vista fisiológico. Sin embargo, proporcionan oportunidades para la evolución de nuevas funciones en la naturaleza y en el laboratorio (Patrick W. y Matsumura I., *et al.*, 2008; Kapoor M., *et al.*, 2012; Jia B., *et al.*, 2013; Baker M., *et al.*, 2015; Copley S., 2015). Además, las secuencias de los ORF A1, A3 y C4 fueron alineados contra la base de datos LED. Los hits obtenidos se muestran en la tabla No. 24.

Tabla No. 24. Resultados obtenidos del alineamiento de los ORF A1, A3 en la clona HBMqC-A y C4 en la clona HBMqC-C en la base de datos LED.

ORF	Valor esperado (e)	Porcentaje de similitud (aa)	Porcentaje de Identidad (aa)	Observaciones
A1-HBMqC-A	0.017	59/141 (41 %),	39/141 (27 %)	Esterasa de la superfamilia abH04
A3-HBMqC-A	2e-28	119/236 (50 %)	82/236 (34 %)	Epoxihidrolasa de la superfamilia abH08.02 - Gamma proteobacterium
C4-HBMqC-C	0.002	40/77 (51 %),	30/77 (38 %),	Epoxihidrolasa de la superfamilia abH08.02

En consecuencia, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias reportadas como esterases incluyendo los marcos de lectura A1, A3 y C4 para buscar motivos conservados. El ORF A1 contiene la secuencia consenso –Ala-Xaa₁-Ser-Xaa₂-Gly- característico de las lipasas de la familia I.2 (Arpigny J. y Jaeger K-E., 1999).

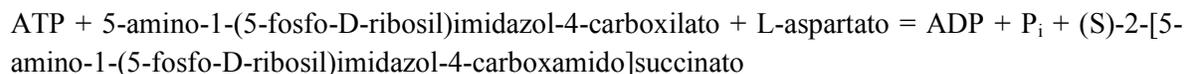
De acuerdo a lo mencionado anteriormente, las enzimas codificadas en las clonas seleccionadas como CEH positivas son enzimas oxidoreductasas por la calidad del alineamiento contra las bases de datos. Sin embargo, estas enzimas contienen en su secuencia el pentapéptido conservado similar a los de las enzimas CEH en regiones localizadas de la secuencia similar a CEH reportadas, esto podría permitirles realizar la catálisis de otros sustratos diferentes a los nativos.

Los ORF H2 y H3 contenidos en la clona HBMqC-H fueron anotados como fosforibosilamino-glicina ligasa (GAR) y fosforibosilimidazol-succinocarboxamida sintasa (SAICARs), respectivamente. GAR (EC 6.3.4.13) es una enzima implicada en el metabolismo de purinas y cataliza la síntesis o ruptura del enlace carbono-nitrógeno de un grupo amida, implicado en la formación del ribonucleótido glicinamida (Hartman S., *et al.*, 1958; Kanehisa M. y Goto S., 2000; Finn R., *et al.*, 2014; NC-IUBMB, 2015).

La reacción que cataliza GAR puede expresarse de la siguiente manera:



SAICARs (EC 6.3.2.6) es una enzima implicada principalmente en la síntesis de *novo* de purinas y cataliza la formación de enlaces carbono-nitrógeno para la producción del ribósido intermediario succinilaminoimidazolecarboxamida (Lukens L., *et al.*, 1959; Kanehisa M. y Goto S., 2000; NC-IUBMB, 2015). La reacción se representa de la siguiente manera:



Se ha reportado que varias enzimas implicadas en el metabolismo de purinas son capaces de reconocer sustratos diferentes a los nativos y transformarlos (sustratos fosforibosilados). Por lo cual SAICAR es utilizada en el desarrollo de agentes antimicrobianos y quimioterapéuticos (Ginder N., 2008; Patrick W. y Matsumura I., *et al.*, 2008).

Los ORF F6 contenidos en la clona HBMqC-F, G2 y G3 contenidos en la clona HBMqC-G alinearon contra proteínas transportadoras con bajos porcentajes de identidad. Esto probablemente indica que la secuencia aislada pertenece a algún microorganismo que no ha sido identificado o cultivado. Por esta razón, fueron alineados contra secuencias reportadas de CEH de diversas familias (Figura No. 21). En el ORF F6 se encontró el pentapéptido consenso –Gly-Xaa₁-Ser-Xaa₂-Gly- característico de las esterasas de la familia I.1 (Arpigny J. y Jaeger K-E., 1999).

Las secuencias conservadas –Ala-Xaa₁-Ser-Xaa₂-Gly- y –Gly-Xaa₁-Ser-Xaa₂-Gly- encontradas en los ORF A1 y F6 sugieren ser los responsables del fenotipo observado en las clonas HBMqC-A y HBMqC-F, respectivamente. Sin embargo, no es posible asegurarlo, ya que sería necesario realizar un alineamiento de estructura terciaria para corroborar que estos aminoácidos efectivamente participen en la catálisis. Además, es necesario realizar la caracterización bioquímica de las enzimas aisladas para confirmar su identidad.

Respecto al ORF G3, se encontró una secuencia consenso –Ser-Xaa₁-Xaa₂-Lys- característica de las enzimas tipo β-lactamasas clasificadas dentro de la familia VIII (Arpigny J. y Jaeger K-E., 1999; Ouyang L-M., *et al.*, 2013). Sin embargo, al realizar el alineamiento del ORF G3 con secuencias conocidas de esta familia, la secuencia –Ser-Xaa₁-Xaa₂-Lys- no coincide con las regiones conservadas en las secuencias reportadas (Figura No. 22).

Los ORF C5 de HBMqC-C, F5 de la clona HBMqC-F, G4 de HBMqC-G y el I1 de la clona HBMqC-I al ser alineados en las bases de datos fueron anotados como proteínas hipotéticas. En las secuencias de los ORF no se encontraron secuencias conservadas para esterasas. Posteriormente, se realizó la predicción de la estructura secundaria con el programa Jpred 4. El programa alinea la secuencia de interés contra secuencias de estructura conocida contenidas en una base de datos para proporcionar una asignación más precisa. Sin embargo, estas proteínas no tienen patrones estructurales similares a los reportados. Probablemente, las bases de datos lo anotaron como “proteína hipotética” porque no se ha estudiado la función que cumplen o porque son genes que pertenecen a microorganismos que no se han identificado (Sivashankari S., *et al.*, 2006). Cabe

mencionar que la clona HBMqC-I destacó por su capacidad de hidrolizar acetato de α -naftilo en las pruebas en microplaca, basado en la intensidad de color del complejo formado.

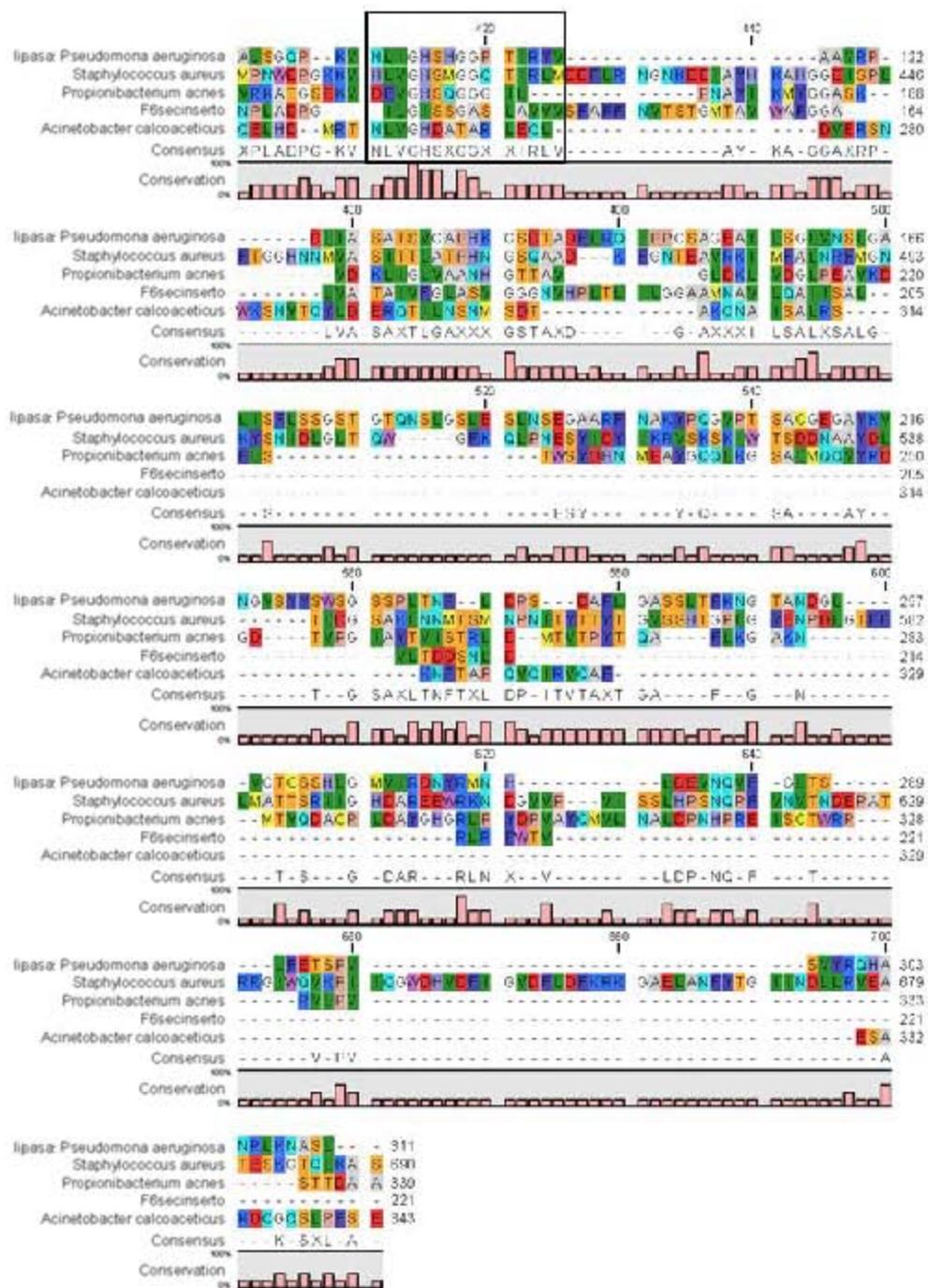


Figura No. 21. Alineamiento de secuencias esterasa de la familia I con el ORF F6-HBMqC-F indicado como F6secinserto. Secuencias utilizadas y su número de acceso: Lipasa *Pseudomonas aeruginosa*/D50587, *Acinetobacter calcoaceticus*/X80800, *Staphylococcus aureus*/M12715, *Propionibacterium acnes*/X99255. Rectángulo negro muestra la secuencia conservada -Gly-Xaa₁-Ser-Xaa₂-Gly-.

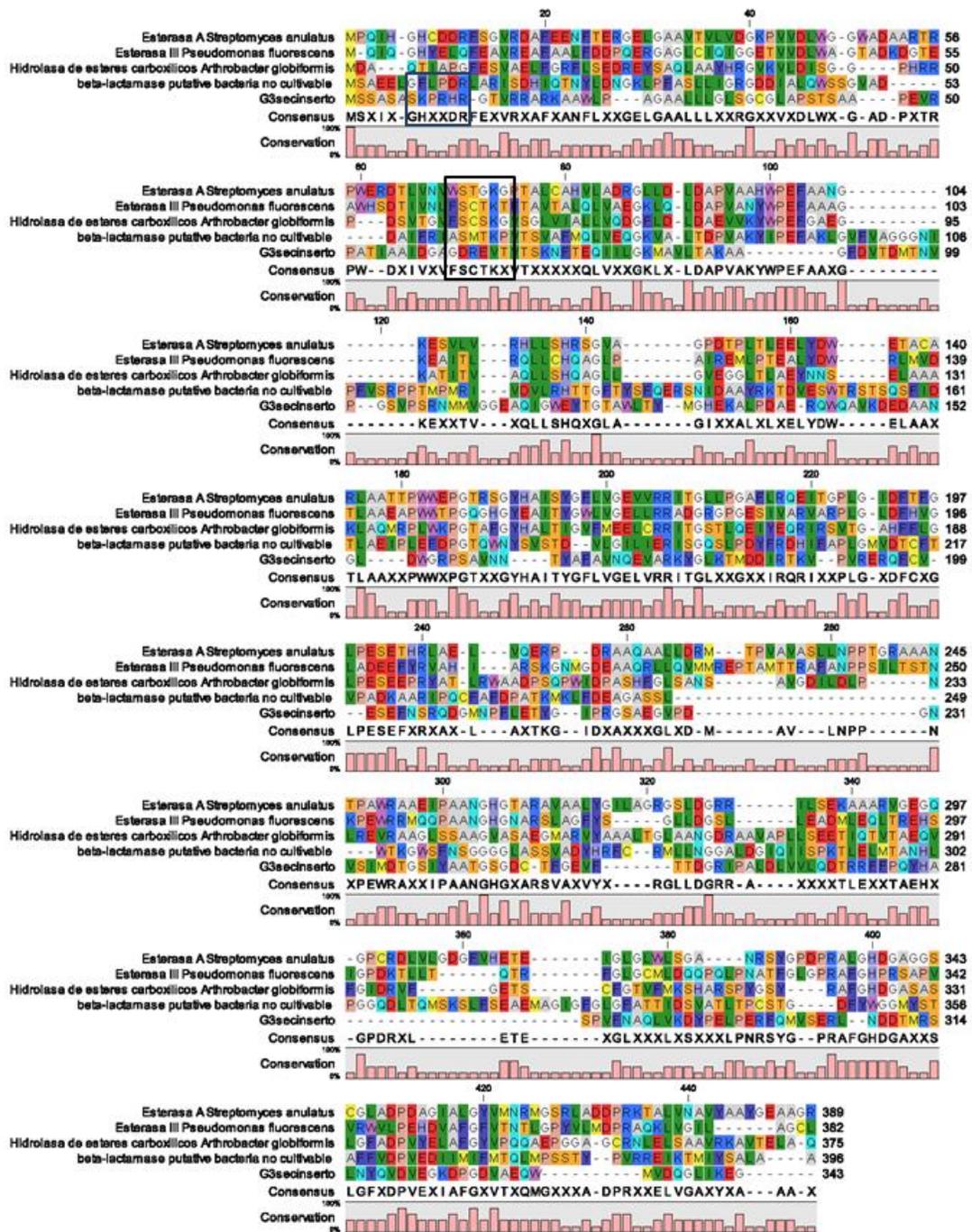


Figura No. 22. Alineamiento de secuencias esterasa de la familia VIII con el ORF G3-HBMqC-G indicado como G3secinserto. Secuencias utilizadas y su número de acceso: Esterasa A *Streptomyces anulatus* (Z15137.1), Esterasa III *Pseudomonas fluorescens* (S69066.1), β -lactamasa putativa clase C bacteria no cultivable WWR5-2005 (DQ022078.1), Carboxilesterasa *Arthrobacter globiformis* (L22516.1). Rectángulo azul denota la secuencia –Ser-Xaa₁-Xaa₂-Lys- en el ORF G3. Rectángulo negro muestra la secuencia conservada –Ser-Xaa₁-Xaa₂-Lys- en los genes reportados.

Por otra parte, dentro del ORF C7 contenido en la clona HBMqC-C se encontró una secuencia homóloga a una proteína de la familia de las integrasas. Los estadísticos del programa BLASTp y

UniProt reflejan un alineamiento con 100 % (aa) de identidad y 100 % (aa) de similitud, por lo que muy probablemente el segmento de ADN insertado corresponde a una proteína de la familia de las integrasas del microorganismo *Propionibacterium acidipropionici*, pero no es la secuencia responsable de la expresión observada.

En este trabajo se deseaba encontrar enzimas CEH, en cierto modo, los resultados obtenidos distan del objetivo. Es muy probable que la variabilidad de resultados se deba entre otras cosas a la inespecificidad de la prueba de hidrólisis de acetato de α -naftilo y tributirina. Existen numerosas investigaciones que coinciden en la detección de falsos positivos por la hidrólisis de acetato de α -naftilo y que posteriormente son identificados como enzimas oxidorreductasas, transferasas, sulfatasas, etc. (Ferrer M., *et al.*, 2005; Litthauer D., *et al.*, 2010; Jiménez D., *et al.*, 2012; Salazar C., 2013; Morales G., 2015). Actualmente, estos dos sustratos son los más usados para realizar escrutinios funcionales de enzimas con actividad lipolítica en bibliotecas metagenómicas pese a los inconvenientes reportados (Jiang X., *et al.*, 2012; Jiménez D., *et al.*, 2012; Shao H., *et al.*, 2013; Biver S., *et al.*, 2013; Zhu Y., *et al.*, 2013). Algunos métodos propuestos para disminuir los falsos positivos incluye utilizar otros sustratos de longitud media que puedan ser hidrolizados tanto por carboxilesterasas como lipasas, por ejemplo: tricaproína (TC6:0) o tricaprilina (TC8:0) (Litthauer D., *et al.*, 2010). Además, es necesario implementar una combinación de estrategias de tamizaje más robustas para disminuir los umbrales de detección.

Una desventaja en la selección funcional de genes en las bibliotecas metagenómicas es que no es posible determinar el origen filogenético del fragmento de ADN recientemente aislado. La búsqueda de genes basado en función depende de la detección específica del fenotipo expresado por el gen de interés y es poco probable conocer la identidad del microorganismo del que proviene. Por lo cual, no podemos asegurar el origen del que provienen los genes seleccionados. No obstante, algunos resultados obtenidos de los alineamientos de las secuencias de las clonas CEH+ seleccionadas contra BLASTn contrastadas con las anotaciones realizadas con bases curadas y no curadas como BLASTp y UniProt, coinciden con los microorganismos previamente identificados en el grupo de trabajo. Recientemente, se confirmó la presencia de *Kocuria rhizophila* y *K. marina* en el queso Cotija, además destacaron por su capacidad lipolítica y proteolítica, respectivamente (Robles C., 2014). Los géneros *Propionibacterium* y *Leuconostoc* fueron expuestos en estudios de secuenciación masiva del metagenoma del queso Cotija (Escobar-Zepeda A., En revisión).

Los géneros *Bifidobacterium* y *Corynebacterium* no han sido identificados en el queso Cotija, sin embargo, es probable que pudieran ser parte del consorcio de microorganismos del alimento ya que se han reportado como parte de la microbiota de quesos madurados (Mounier J., *et al.*, 2007; Schröder J., *et al.*, 2011; Bunesova V., *et al.*, 2014).

Los resultados mostrados no descartan la posibilidad de haber aislado una enzima CEH, el análisis bioinformático realizado fue astringente en el sentido de que se tomaron solo aquellos hits con un alto porcentaje de similitud y de identidad, con el objetivo de que los alineamientos garantizaran ser los responsables de la función observada. Sin embargo, se ha reportado que los alineamientos de secuencias entre proteínas de estructura similar, se pueden distinguir de otros, cuando el porcentaje de identidad es mayor al 40 % (aa) y el porcentaje de cobertura es mayor o igual al 70 % (aa) (Rost B., 1999).

Por otra parte, se pueden utilizar algunos programas de anotación metagenómica que predicen la existencia de ORF en secuencias interrumpidas al borde de un contig o secuencias que no contienen un codón de inicio, es decir, ORF parciales en los seis posibles marcos de lectura.

Es muy probable, que por las características fisicoquímicas y microbiológicas del queso Cotija la biblioteca contenga genes que codifiquen para enzimas CEH. Sin embargo, es necesario considerar la incapacidad para expresar de forma detectable una fracción mayor de los genes de interés en fagos λ . Una alternativa para facilitar la detección de los genes diana sería estabilizar y almacenar el metagenoma de queso Cotija en el fagémido pBK-CMV contenido en la cepa de expresión *E. coli* XL0LR. De esta manera, se pueden utilizar medios selectivos a la par de otras estrategias de tamizaje.

Una limitación primordial de la búsqueda funcional de enzimas está asociada con el uso de un sistema de expresión heteróloga (uso de codones y factores de iniciación de la transcripción y traducción, modificaciones post-traduccionales, sistema de plegamiento o excreción, etc.). Por esta razón, se sugiere que el plásmido sea introducido en múltiples hospederos para aumentar la probabilidad de expresión de los genes. Se ha demostrado, que una parte sustancial de los genes transformados no pueden ser expresados con éxito en un solo organismo y que el uso de múltiples hospederos de forma secuencial o en paralelo ofrece grandes ventajas. Las cepas bacterianas de géneros como *Burkholderia*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Streptomyces* y *Pseudomonas* se han reportado como huéspedes alternativos (Ekkers D. M., *et al.*, 2012).

Finalmente, cabe resaltar que la biblioteca metagenómica de queso Cotija construida podría ser la primera que explora el potencial metabólico de un alimento fermentado, ya que las reportadas hasta éste momento son bibliotecas para secuenciación masiva (Jung J., *et al.*, 2011; Kiyohara M., *et al.*, 2012).

La construcción de una biblioteca metagenómica implica la superación de un gran número de obstáculos. Entre ellos están los tecnológicos y metodológicos que son hasta cierto punto manipulables. Sin embargo, hay muchos otros que pueden ser o no considerados por la información con la que se cuenta hasta este momento. Existen otros factores que dificultan el aislamiento de genes de interés, como ya se mencionó, la promiscuidad que presentan las enzimas para catalizar otros sustratos aunado a la inespecificidad de los métodos funcionales, el conocimiento de los microorganismos que representa del 0.1 al 1% de la diversidad total de bacterias en el planeta, los datos no confirmados en las bases de datos disponibles, entre otros.

Pese a todas las limitaciones que puedan existir, la metagenómica funcional junto con la de secuencia, son potentes herramientas que permiten estudiar el metagenoma de un hábitat y hace accesible el potencial metabólico incluso de microorganismos no cultivables.

8. CONCLUSIONES

- Se logró construir una biblioteca del metagenoma del queso Cotija. Ésta consta de 136 950 clonas, las cuales representan 0.821 Gpb. La biblioteca obtenida tiene las características necesarias para ser el punto de partida en otras investigaciones.
- En el escrutinio funcional de la biblioteca metagenómica, se lograron aislar 13 clonas con presunta actividad CEH.
- El análisis de las secuencias de las clonas seleccionadas mediante el escrutinio funcional en la biblioteca metagenómica supone el aislamiento de enzimas diferentes a las CEH, como: oxidorreductasas (ferredoxina, deshidrogenasa), proteínas trasportadoras (hierro y glicina/betaina), proteínas involucradas en el metabolismo de purinas (GAR y SAICARs) y proteínas hipotéticas.
- Estos resultados indican que los sustratos acetato de α -naftilo y tributirina, resultan inespecíficos para la búsqueda y selección de genes CEH.
- A pesar de que se encontraron secuencias conservadas características de enzimas CEH en los ORF A1 y F6 de las clonas HBMqC-A y HBMqC-F respectivamente, no es posible asegurar que sean los responsables de la actividad expresada.

9. PERSPECTIVAS

- Realizar alineamientos estructurales, caracterización bioquímica y determinación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas expresadas en las clonas HBMqC-A, HBMqC-C, HBMqC-F, HBMqC-G, HBMqC-H, HBMqC-I.
- Realizar la secuenciación de los insertos de las clonas CEH positivas HBMqC-B, HBMqC-D, HBMqC-E, HBMqC-J, HBMqC-K, HBMqC-L y HBMqC-M, así como, la caracterización de las enzimas que resulten de interés.
- Empezar una nueva búsqueda de enzimas con actividad CEH en la biblioteca metagenómica utilizando combinaciones de estrategias de tamizaje y sustratos de longitud media.
- Explorar la diversidad funcional del metagenoma en la biblioteca metagenómica del queso Cotija en búsqueda de genes codificantes para bacteriocinas, proteasas y enzimas implicadas en el desarrollo de aromas y sabores, con potencial biotecnológico.

10. BIBLIOGRAFIA

- Akoh C., Lee G., Liaw Y., Huang T., y Shaw J. (2004). GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog Lip Res.* 43: 534-552.
- Alcántara S. (2009). Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica de *Bacillus pumilus* aislado de un producto lácteo tradicional mexicano. Tesis de maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E. W. y Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215: 403-410.
- Álvarez B., Barragán L., Chombo M. (2005). Reglas de uso. Marca colectiva (Queso Cotija Región de Origen). Impreso en México.
- Arora B., Mukherjee J., Gupta M. (2014). Enzyme promiscuity: using the dark side of enzyme specificity in white biotechnology. *Sustain Chem Process.* 2:25.
- Arpigny J. y Jaeger K-E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J.* 343: 177-183.
- Avilés P. (2014). Aislamiento e identificación de bacterias halófilas a partir de sal de grano. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Baker M., Nelson D., Studer R. (2015). Origin of the response to adrenal and sex steroids: Roles of promiscuity and co-evolution of enzymes and steroid receptors. *J Steroid Biochem.* 151: 12–24.
- Besemer J. y Borodovsky M. (2005). GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses. *Nucleic Acids Res.* 33 (Web Server issue):W451-4.
- Biver S. y Vandenbol M. (2013). Characterization of three new carboxylic ester hydrolases isolated by functional screening of a forest soil metagenomic library. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 40:191-200.
- Bonilla-Rosso G., Souza V., Eguiarte L. (2008). Metagenómica, genómica y ecología molecular: la nueva ecología en el bicentenario de Darwin. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 11: 41-51.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Bravo M. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas del queso Cotija. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Bunesova V., Killer J., Vlkova E., Musilova S., Tomaska M., Rada V., Kmet V. (2014). Isolation and characterization of bifidobacteria from ovine cheese. *Int J Food Microbiol.* 188: 26–30.

-
- Carrera J. (2003). Producción y aplicación de enzimas industriales. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad del Cauca. Popayán. 1: 9-15.
- Casillas H. (2013). Caracterización molecular de la microbiota del queso Cotija elaborado en diversas regiones de México. Tesis de maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.
- Castro R. (2014). Inmovilización y caracterización bioquímica de carboxilesterasas de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Chandra P. y Wikel S. (2005). Analyzing ligation mixtures using a PCR based method. *Biol Proced Online*. 7: 93–100.
- Chen K. y Pachter L. (2005). Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. *PLoS Comput Biol* 1: e24
- CLC bio Genomics Workbench 7.6, QIAGEN Company. (2015) [En línea] (Actualizado 2015). Disponible en: <https://www.qiagenbioinformatics.com/> [Último acceso el 20 de septiembre 2015].
- Collins Y., Mc. Sweeney P. y Wilkinson M. (2003a). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int Dairy J*. 13: 841–866.
- Collins Y., Mc. Sweeney P. y Wilkinson M. (2004). Capítulo: Lipolysis and catabolism of fatty acid in cheese. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Tercera edición. Elsevier Publishers, London. Volumen. 1. Pág: 373- 386.
- Collins Y., Mc. Sweeney P., Wilkinson M. (2003b). Evidence of a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in cheddar cheese during ripening. *J Dairy Res*. 70:105-13.
- Copley S. (2015). An evolutionary biochemist's perspective on promiscuity. *Trends Biochem Sci*. 40: 72-78.
- Corpet F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res*. 16: 10881-10890.
- Cortés D. (2009). Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa en la búsqueda de bacterias ácido lácticas en un queso artesanal mexicano. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- De Castro E., Sigrist C. J. A., Gattiker A., Bulliard V., Langendijk-Genevaux P. S., Gasteiger E., Bairoch A. y Hulo N. (2006). ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res*. 1:W362-5.
- Drozdetskiy A., Cole C., Procter J., Barton G. J. (2015). JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucl Acids Res*. doi:10.1093/nar/gkv332.
- Ekkers D. M., Cretoiu M. S., Kielak A. M. y van Elsas J. D. (2012). The great screen anomaly—a new frontier in product discovery through functional metagenomics. *Appl Microbiol Biotechnol*. 93:1005–1020.
-

Elend C., Schmeisser C., Leggewie C., Babiak P., Carballeira J.D., Steele H.L., Reymond J.-L., Jaeger K.-L., Streit W.R. (2006). Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Appl Environ Microb.* 72: 3637-3645

Epicentre. (2012). Copy Control™ Fosmid library, Production kit with pCC1FOSTM vector. Epicentre and Illumina Company. Pág. 31.

Ercolini D. (2003). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Meth.* 56: 297-314.

Ergerton F. N. (2006). History of the Ecological Sciences, Part 19: Leeuwenhoek's Microscopic Natural History. *Ecol Appl.* 87:47-58.

Escobar-Zepeda A. (2012). Estudio de la distribución espacial de la microbiota bacteriana en queso Cotija por la técnica de FISH. Tesis de maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.

Escobar-Zepeda A. Análisis taxonómico y funcional del metagenoma del queso Cotija. Tesis de doctorado. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. UNAM. En revisión.

Fernández T. (2005). Clonación, expresión y evolución molecular de la lipasa I de *Galactomyces geotrichum*. Editorial de la Universidad de Granada. Pág.: 23-36.

Ferrer M. (2004). Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables. *Sociedad Española de Microbiología, Boletín informativo.* 38:11-17.

Ferrer M., Beloqui A., Timmis K., Golyshin P. (2009). Metagenomics for Mining New Genetic Resources of Microbial Communities. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 16:109-123.

Ferrer M., G. O. V., Chernikova T. N., Khachane A. N., Reyes-Duarte D., Martins Dos Santos V. A. P., Strompl C., Elborough K., Jarvis G., Neef A., Yakimov M. M., Timmis K. N. y Golyshin P. N. (2005). Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora." *Environ Microbiol.* 7: 1996-2010.

Finn R., Bateman A., Clements J., Coggill P., Eberhardt R., Eddy S., Heger A., Hetherington K., Holm L., Mistry J., Sonnhammer E., Tate J., Punta M. (2014). Pfam: the protein families database. *Nucl Acids Res.* 42: D222-D230.

Fischer M. y Pleiss J. (2003). The lipase engineering database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucl Acid Res.* 31:319-321.

García G., Revah S., Gómez R. (2004). Capítulo 6: Productos lácteos. Biotecnología alimentaria. Editorial Limusa. Primera edición. México. Pág.: 189-194.

García S. (2006). Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso Cotija. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

-
- García S. (2011). Detección de microorganismos lipolíticos durante las etapas de elaboración de un queso artesanal mediante técnica molecular. Tesis de maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.
- Ginder N. (2008). "The structure and mechanism of SAICAR synthetase". *Retrospective Theses and Dissertations*. Paper 15798.
- Gómez C. (2010). Identificación de bacterias halófilas presentes en queso Cotija por métodos independientes de cultivo. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Handelsman J. (2004). Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev*. 68: 669-685.
- Hartman S. y Buchanan J. (1958). Biosynthesis of the purines: XXII. 2-amino-N-ribosylacetamide-5'-phosphate Kinoshynthase. *J Biol Chem*. 233: 456-461.
- Hasan F., Shah A., Hameed A. (2005). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Tech*. 39: 235-251.
- Hasan F., Shah A., Hameed A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnol Adv*. 27:782-798.
- Heath C., Xiao P., Cary S., y Cowan D. (2009). Identification of a novel alkaliphilic esterase active at low temperatures by screening a metagenomic library from antarctic desert soil. *Appl Environ Microb*. 75: 4657-4659.
- Henne A., Schmitz R., Bömeke M., Gottschalk G. y Daniel R. (2000). Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microb*. 66: 3113-3116.
- Hernández B. (2007). Queso Cotija: Estudio del análisis fisicoquímico, proximal y actividad antioxidante. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Hernández M. (2007). Identificación de bacterias proteolíticas aisladas de queso Cotija, un estudio microbiológico y fisicoquímico. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Humanizing Genomics Macrogen (2015). Sequencing [En línea] (Actualizado 2015). Disponible en: http://www.macrogen.com/eng/business/seq_overview.html [Último acceso el 20 de septiembre 2015].
- Jaeger K-E., Dijkstra B. W., Reetz M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnical applications of lipases. *Annu Rev Microbiol*. 53: 315-351.
- Jaeger K-E., Ransac S., Dijkstra B. W., Colson C., Heuvel M., Misset O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev*. 15: 29-63.
- Jia B., Cheong G-W., Zhang S. (2013). Multifunctional enzymes in archaea: promiscuity and moonlight. *Method Microbiol*. 17:193-203.
-

-
- Jiang X., Xu X., Huo Y., Wu Y., Zhu X., Zhang X., Wu M. (2012). Identification and characterization of novel esterases from a deep-sea sediment metagenome. *Arch Microbiol.* 194:207–214.
- Jiménez D., Montaña J., Álvarez D., Baena S. (2012). A novel cold active esterase derived from Colombian high Andean forest soil metagenome. *World J Microb Biot.* 28: 361-370.
- Joseph B., Ramteke P.W., Thomas G. (2008). Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnol Adv.* 26: 457-470.
- Jung J., Lee S., Kim J., Park J., Bae J-W., Hahn Y., Madsen E., Jeon C. (2011). Metagenomic analysis of kimchi, a traditional korean fermented food. *Appl Environ Microbiol.* 77: 2264–2274
- Kanehisa M. y Goto S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research.* 28: 27–30.
- Kapoor M., Gupta M. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem.* 47: 555–569.
- Khan M., Jithesh K., Mookambikay R. (2013). Cloning and characterization of two functionally diverse lipase from soil metagenome. *J Gen Appl Microbiol.* 59: 21-31.
- Kim K-S., Pallagry C. K. (1996). Purification of plasmid DNA (miniprep) with high yields using diatomaceous earth. U.S. Dept. Commerce/NOAA/NMFS/Molecular Biology Protocols: <http://www.nwfsc.noaa.gov/protocols/dna-prep.html>.
- Kim Y., Kim S, Yoon G., Kim Y., Ryu Y. (2006). Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein Expr Purif.* 45: 315- 323.
- Kiyohara M., Koyanagi T., Matsu H., Yamamoto K., Take H., Katsuyama Y., Tsuji A., Miyamae H., Kondo T., Nakamura S., Katayama T., Kumagai H. (2012). Changes in microbiota population during fermentation of Narezushi as revealed by pyrosequencing analysis. *Biosci Biotech Bioch.* 76: 48-52.
- Knight R., Jansson J., Field D., Fierer N., Desai N., Fuhrman J. A., Gilbert J. A. (2012). Unlocking the potential of metagenomics through replicated experimental design. *Nat Biotechnol.* 30:513–20.
- Kong L., Zhang Y., Ye Z., Liu X., Zhao S., Wei L., Gao G. (2007). CPC: assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine. *Nucleic Acids Res.* 35:W345-9.
- Li W., Cowley A., Uludag M., Gur T., McWilliam H., Squizzato S. , Park Y. M., Buso N. y López R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucl Acids Res.* 43: W580-4.
- Litthauer D., Abbai N.S., Piater L. A., Heerden E van. (2010). Pitfalls using tributyrin agar screening to detect lipolytic activity in metagenomic studies. *Afr J Biotechnol.* 9: 4282-4285.
-

-
- Lukens L., Buchanan J. (1959). Biosynthesis of the purines. XXIV. The enzymatic synthesis of 5-amino-1-ribosyl-4-imidazolecarboxylic acid 5'-phosphate from 5-amino-1-ribosylimidazole 5'-phosphate and carbon dioxide. *J Biol Chem.* 234: 1799-805.
- Marilley L. y Casey M. (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int J Food Microbiol.* 90: 139– 159.
- Marth E. (1963). Microbiological and chemical aspects of cheddar cheese ripening. A Review. *J Dairy Sci.* 46: 869–890.
- Martínez P. (2009). Identificación de levaduras en el queso Cotija por métodos moleculares dependientes e independientes de cultivo (ARDRA, RFLP y DGGE). Tesis de maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.
- Mei-Fong P., Noorlidah A., Choon-Weng L., Ching-Ching N. (2008). Isolation of high molecular weight DNA from forest topsoil for metagenomic analysis. *Asia Pac J Mol Biol Biotechnol.* 16:35-41.
- Miller R. B., y Karn R. C. (1980). A rapid spectrophotometric method for the determination of esterase activity. *J Biochem Biophys Meth.* 3: 345-354.
- Morales G. (2015). Purificación y caracterización de la enzima recombinante anc2 de *Aspergillus nidulans*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Mounier J., Rea M., O'Connor P., Fitzgerald G., Cogan T. (2007). Growth characteristics of *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, and *Staphylococcus* spp. isolated from surface-ripened cheese. *Appl Environ Microbiol.* 73:7732-7739.
- NC-IUBMB: Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. (2015). Recommendations on Biochemical & Organic Nomenclature, Symbols & Terminology etc. [En línea] (Actualizado al 21 de Agosto 2015). Disponible en: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/> [Último acceso el 16 de septiembre de 2015].
- Nevalainen T. (2010). 1-Cysteine peroxiredoxin: A dual-function enzyme with peroxidase and acidic Ca²⁺-independent phospholipase A2 activities. *Biochimie.* 92: 638-644.
- Norma Mexicana NMX-F-735-COFOCALEC-2011. Sistema Producto Leche – Alimentos – Lácteos – Alimentos Lácteo Regional – Queso Cotija Artesanal Madurado – Denominación, especificaciones y métodos de prueba.
- Ouyang L-M., Liu J., Qiao M. y Xu J. (2013). Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Appl Biochem Biotech.* 169: 15-28.
- Patrick W. y Matsumura I. (2008). A study in molecular contingency: glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase is a promiscuous and evolvable phosphoribosylanthranilate isomerase. *J Mol Biol.* 377: 323–336.
-

Peña García G. C. (2011). Búsqueda y caracterización de enzimas hidrolíticas bacterianas de interés industrial obtenidas del metagenoma del Pozol. Tesis de maestría. Departamento de ciencias biológicas y de la salud. UAM.

Peña M. (2009). Análisis de la expresión y caracterización de la esterasa SteI involucrada en la biosíntesis de esterigmatocistina en *Aspergillus nidulans*. Tesis de doctorado. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.

Peña M. y Quirasco B. (2014). ¿Enzimas en los alimentos? Bioquímica de lo comestible. *Revista Digital Universitaria*. 15: 1-13.

Perrera J., Tormo A., García J. (2010). Ingeniería Genética, Volumen I: Preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA. Primera edición. Madrid. Editorial Síntesis.

Pinto R. (2013). UF1284: Yogures, leches fermentadas y pastas untables. Primera edición. España. IC Editorial.

PrimerQuest® program, IDT, Coralville, USA. Retrieved (2012). [En línea] (Actualizado 2015). Disponible en: <http://www.idtdna.com/Scitools>. [Último acceso el 20 de septiembre 2015].

PROY-NMX-F-700-COFOCALEC-2012, SISTEMA PRODUCTO LECHE – ALIMENTO – LÁCTEO – LECHE CRUDA DE VACA – ESPECIFICACIONES FISICOQUÍMICAS, SANITARIAS Y MÉTODOS DE PRUEBA.

Rajendran A., Palanisamy A., Thangavelu V. (2006). Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. *Braz Arch Biol Technol*. 52: 207-219.

Ranjan R., Grover A., Kapardar K. R., Sharma R. (2005). Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. *Biochem Biophys Res Commun*. 335: 57–65.

Reyes-Duarte D., Ferrer M., Golyshin P. (2007). Conociendo lo incultivable: metagenoma y biocatálisis. Memorias del 6º Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. Univ. Autónoma de Chapingo. México, D.F. (formato electrónico).

Reyes-Duarte D., Polaina J., López-Cortés N., Alcalde M., Plou F. J., Elborough K., Ballesteros A., Timmis K. N., Golyshin P. N. y Ferrer M. (2005). Conversion of a carboxylesterase into a triacylglycerol lipase by a random mutation. *Chem Int Ed*. 44: 7553 –7557.

Rivera-Pérez C., García-Carreño F. (2007). Enzimas lipolíticas y su aplicación en la industria del aceite. *BioTecnología*. 11: 37-45.

Robles C. (2014). Identificación molecular de microorganismos aislados del queso y de sus materias primas. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

Rodríguez-Pinilla J., Marquez G., Tabla P., Ramírez R. Delgado F. (2015). Microbiological and lipolytic changes in high-pressure-treated raw milk cheeses during refrigerated storage. *Dairy Sci Technol*. 95: 425-436.

-
- Roh C. y Villatte F. (2008). Isolation of a low-temperature adapted lipolytic enzyme from uncultivated micro-organism. *J Appl Microbiol.* 105: 116-123.
- Rost B. (1999). Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng.* 12 (2): 85–94.
- Salazar C. (2013). Expresión en *E. coli* de la peroxiredoxina YKUU de *Bacillus pumilus* GMA1. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Superior de los Ríos. Tabasco, México.
- Sambrook J. y Rusell D. (2001). Volumen 1: Molecular Cloning, A laboratory manual. New York. Tercera edición. Cold Spring Harbor.
- Schröder J., Maus I., Trost E., y Tauch A. (2011). Complete genome sequence of *Corynebacterium variabile* DSM 44702 isolated from the surface of smear-ripened cheeses and insights into cheese ripening and flavor generation. *BMC Genomics.* 12:545.
- Shao H., Xu L., Yan Y. (2013). Isolation and characterization of a thermostable esterase from a metagenomic library. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 40:1211-1222.
- Sivashankari S., Shanmughavel P. (2006). Functional annotation of hypothetical proteins – A review. *Bioinformation.* 1: 335 -338.
- Streit W. y Schmitz R. (2004). Metagenomics - the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol.* 7: 492-498.
- Tanaka J. y Ikeda S. (2002). Rapid and efficient DNA extraction method from various plant species using diatomaceous earth and a spin filter. *Breed Sci.* 52:151-155.
- The UniProt Consortium. (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* 43: D204-D212.
- Tirawongsaroj P., Sriprang R., Harnpicharnchai P., Thongaram T., Champreda V., Tanapongpipat S., Eurwilaichitr L. (2008). Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a thailand hot spring metagenomic library. *J Biotech.* 133: 42-49.
- Torsvik V., Øvreås L., Thingstad T. F. (2002). Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science.* 296: 1064-1066.
- Uhlig H. (1998). Industrial enzymes and their applications. Wiley-interscience publication, Primera edición, EUA. Pág.: 179.
- Van Lanen S. y Shen B. (2006). Microbial genomics for the improvement of natural product discovery. *Curr Opin Microbiol.* 9:252–260.
- Vélez P., Rodríguez E., Moreno P. (2002). Curso introductorio de biología molecular construcción de bibliotecas de ADN-recombinante en el bacteriófago lambda. Primera edición. Editorial Universidad del Cauca. Colombia. Pág.: 97.
- Verger R. (1997). Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* 15: 32-38.

-
- Vieites J., Guazzaroni M-E., Beloqui A., Golyshin P., Ferrer M. (2010). Molecular methods to study complex microbial communities En: Streit W., Daniel R. eds. *Metagenomics: Methods and Protocols*. New York: Springer Science, Bussines Media. Pág: 1-40.
- Weimer B. (2007). *Improving the flavour of cheese*. Primera edición. Editorial Woodhead Publishing Limited. Pág.: 144-156.
- Whitman W. B., Coleman D.C. y Wiebe W. J. (1998). Procaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci*. 95: 6578-6583.
- Wooley J. C., Godzik, A. y Friedberg I. (2010). A primer on metagenomics. *PLoS Comput Biol*. 6: e1000667.
- Wu C. y Sun B. (2009). Identification of novel esterase from metagenomic library of Yangtze River. *J Microbiol Biotech*. 19 (2): 187-193.
- Yuan S., Cohen D., Ravel J., Abdo Z., Forney L. (2012). Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PLoS ONE*. 7: e33865.
- Yun-Jung K., Gi-Sub C., Seung-Bum K., Gee-Sun Y., Yong-Sung K., Yeon-Woo R. (2006). Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein Express Purif*. 45: 315–323.
- Zhang T., Han W.-J., Liu Z.-P. (2009). Gene cloning and characterization of a novel esterase from activated sludge metagenome. *Microb Cell Fact*. 8: 67.
- Zhu Y., Li J., Cai H., Ni H., Xiao A., Hou L. (2013). Characterization of a new and thermostable esterase from a metagenomic library. *Microbiol Res*. 168: 589-597.
- Zuñiga B. (2009). Descripción e identificación de la comunidad bacteriana en el Cotija por métodos moleculares. Tesis de maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.

11. ANEXOS

11.1. Quesos Cotija que conformar la muestra de trabajo

Se presenta la etiqueta de los quesos Cotija que formaron la muestra de trabajo.

Los números representan los quesos en una población de noventa y cinco.

Identificador de queso Cotija que forman la muestra de estudio			
1	22	29	35
10	23	31	36
14	25	32	37
17	26	34	38
			39

11.2. Recuperación del paquete celular a partir del queso sin enriquecimiento, para extracción de ADN con Kit Fast ID

1. Descongelar los quesos seleccionados en refrigeración por no más de 18 horas previas al experimento.
2. Pesarse 8 g de cada uno de los 10 quesos descongelados dentro de una bolsa para Stomacher en la campana de flujo laminar.
3. Mezclar para homogenizar la muestra.
4. Dividir la mezcla en 3 bolsas para Stomacher con 25 g cada una.
5. Adicionar a cada una de las bolsas con 25g de mezcla de quesos 225 mL de citrato de sodio al 2% (p/v) pH 8.
6. Adicionar 0.5mL de solución de neutrasas (Novo Nordisk) dentro de la campana de flujo laminar.
7. Incubar durante 1 hora a 45 °C.
8. Homogenizar durante 5 min a alta velocidad dentro del Stomacher (*Stomacher 400 circulator, Seward*).
9. Verter aproximadamente 45 mL del contenido de la bolsa en un tubo Falcón de 50mL estéril (hasta 4 tubos por bolsa).
10. Centrifugar (*Heraeus, Biofuge primo R*) a 1500 x g durante 5 min a 4°C.
11. Tomar el contenido de la fase intermedia (aproximadamente 35 mL), cuidando de no mezclar las fases.
12. Centrifugar a 10 000 x g durante 10 min a 4°C para obtener el paquete celular.
13. Re-suspender el pellet en 300 µL de solución salina 0.85% (p/v) pH 7 estéril y transferir a un tubo Eppendorf de 2 mL estéril.
14. Lavar el tubo Falcón con 200 µL de la solución salina estéril y transferir al mismo tubo Eppendorf para obtener un volumen final de 500 µL.
15. Centrifugar 10 000 x g durante 10 min a 4 °C, eliminar el sobrenadante.
16. Puede guardarse el “pellet” en refrigeración y continuar el análisis posteriormente.

17. Se resuspendió el pellet en 1 mL de buffer para DNasa 1X (10 mM Tris HCl pH 7.5, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂).
18. Adicionar 1U de DNasa por tubo.
19. Incubar 20 min a 37 °C.
20. Incubar a 70 °C durante 15 min.
21. Centrifugar a 14 006 x g por 5 min.
22. Eliminar el sobrenadante.
23. Congelar a -20 °C durante toda la noche.

11.3. Recuperación del paquete celular a partir del queso sin enriquecimiento, para extracción de ADN con PCI.

1. La mezcla de quesos elegidos fue descongelada en refrigeración a 4 °C
2. Se pesaron 15 g de mezcla de quesos y se depositaron en una bolsa para Stomacher, todo se trabaja en la campana de flujo laminar.
3. Se adicionó a cada muestra 40 mL de citrato de sodio 2% (p/v), pH 8.0 previamente estéril y se homogenizó en el Stomacher durante 2 min a velocidad alta.
4. Se adicionaron 0.6 mL de neutrasas (*Novo Nordisk*) y se mezcló nuevamente en Stomacher a velocidad alta durante 5 min.
5. Se incubó a 45 °C durante 1 hora a 100 rpm. Terminado este tiempo, la mezcla se dividió en dos tubos Falcon estériles de 50 mL y se centrifugó a 1 698 x g durante 7 min.
6. Los tubos ya centrifugados se dejan reposar en hielo durante 30 min para permitir que la capa de grasa solidifique.
7. La capa de grasa es removida con un hisopo estéril.
8. La fase intermedia fue transferida a un tubo Falcon de 50 mL nuevo, limpio y estéril con ayuda de una pipeta automatizada de 5 mL.
9. Se centrifugó a 19 963 x g durante 10 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante, se eliminó la grasa residual de las paredes con un hisopo estéril y adicionó 15 mL de solución salina al 0.85% (p/v).
10. Se usó vórtex hasta disolver el pellet.
11. Se juntó el contenido de 2 tubos (30 mL finales).
12. Se centrifugó a 19 963 x g y se lavó el pellet 2 veces más con 15 mL solución salina al 0.85% (p/v). Entre cada lavado se eliminaba la grasa residual con hisopos.
13. El pellet lavado de resuspendido en 1 mL de solución salina y se dosificaron 500 µL tubos Eppendorf de 2 mL. Se centrifugó a 13, 300 x g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante.
14. Se resuspendió el pellet en 1 mL de buffer para DNasa 1X (10 mM Tris HCl pH 7.5, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂).
15. Adicionar 1U de DNasa por tubo.
16. Incubar 20 min a 37 °C.
17. Incubar a 70 °C durante 15 min.
18. Centrifugar a 14 006 x g por 5 min.
19. Eliminar el sobrenadante.
20. Congelar a -20 °C durante toda la noche.

11.4. Extracción de ADN utilizando el Kit Fast ID

La extracción y purificación de ADN metagenómico con el kit Fast ID Genetic ID, se basa en la acción conjunta de lisozima y proteinasa K, encargadas de la lisis celular por ruptura de la pared bacteriana y digestión de las proteínas o enzimas liberadas, respectivamente. Además de realizar lisis enzimática, el protocolo cuenta con un buffer que contiene agentes químicos, los cuales, contribuye a desestabilizar la integridad celular.

El buffer de lisis tiene cloruro de guanidina (compuesto caotrópico) que contribuye a la desnaturalización de proteínas debilitando los enlaces de tipo hidrofóbicos, detergentes y sales como EDTA que inhibe enzimas. Posteriormente se realiza una extracción de proteínas y compuestos lipídicos con cloroformo. La fase acuosa formada contiene el ADN que será unido a la columna para finalmente ser lavado con etanol y eluido con agua. Una consideración importante es la utilización de una sal caotrópica que atrape las moléculas de agua y eliminen la capa hidratante que recubre tanto a los ácidos nucleicos como a la sílice de la columna, lo cual, permite a dichas moléculas que interactúen.

Prepara una solución (por cada paquete celular) con:

1mL Genomic lisis buffer (si hay precipitados, calentar a 20-30°C y mezclar)
10 µL Proteinasa K 10 mg/mL (2 – 8 °C)
3 µL lisozima (1 mg/mL)

1. Añadir 1mL de la solución preparada anteriormente a cada paquete celular.
2. Agitar vigorosamente en vórtex.
3. Incubar a 65 °C/ 30 min
4. Adicionar un volumen de cloroformo frío, agitar en vórtex y centrifugar a 9 726 x g durante 5 min.
5. Tomar 500 µL de sobrenadante y transferirlo a un tubo Eppendorf de 2 mL.
6. Adicionar un volumen de Genomic bind buffer y agitar en vórtex.
7. Centrifugara a 9 726 x g durante 5 min.
8. Pasar el sobrenadante a una columna DNA binding (puede ser necesario el uso del Manifold o de una centrifuga).
9. Lavar la columna con 800 µL de Genomic wash buffer usando el manifold o centrifuga.
10. Lavar tres veces la columna, cada uno con 1000 µL de etanol al 75% (v/v) con agua Mili Q usando el Manifold u 800 µL si se usa centrifuga.
11. Centrifugar por unos segundos.
12. Colocar la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo.
13. Adicionar 50 µL de buffer 1xTE a 65 °C.
14. Incubar durante 20 min a 65 °C.
15. Centrifugar a 9 726 x g por 30 segundos y coleccionar el ADN. Desechar la columna.
16. Medir la concentración de ácidos nucleicos en un espectrofotómetro para microplacas *Epoch*, *BioTek* y llevarlo a una concentración aproximada de 130-150 ng/µL por evaporación en un concentrador de ADN.

11.5. Extracción de ADN utilizando el método tradicional con PCI

El método de extracción con PCI se basa realizar la lisis utilizando lisozima y mutanolisina. Se emplea EDTA, SDS y proteinasa K para inactivar y digerir las proteínas o enzimas liberadas al medio. La mayoría de proteínas se extraen con fenol debido a que este solvente permite su desnaturalización y su concentración en la fase orgánica. En tanto que el DNA es recuperado de la fase acuosa. Posteriormente se realiza una extracción con cloroformo para eliminar las proteínas residuales y el fenol. Se pueden realizar dos lavados con cloroformo a fin de eliminar por completo el fenol, ya que puede inhibir reacciones de digestión o ligación. El ADN se lava y precipita con etanol, finalmente se resuspende en buffer TE o preferentemente en agua grado biología molecular.

1. Cada paquete celular se resuspendió en 450 μ L de buffer TE y se adicionaron 50 μ L de una solución de lisozima 10 mg/mL y 10 μ L de una solución de mutanolisina 1U/ μ L en buffer TE.
2. Las muestras fueron agitadas en vórtex durante 1 min e incubadas durante 1 hora a 37 °C a 300 rpm.
3. Adicionar RNasa a una concentración final de 0.6 μ g/mL en incubar a 37 °C durante 30 min.
4. Terminado este tiempo se adicionó a cada tubo 50 μ L de una solución de proteinasa K 10 mg/mL y se incubó 50 min a 50 °C y luego por 10 min a 65 °C.
5. Se dejó enfriar hasta 37 °C y se adicionaron 50 μ L de SDS al 10% (p/v) y se incubó a 37 °C por 40 min.
6. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 200 μ L de una solución de NaCl 5 M, mezclando lentamente por inversión.
7. Se adicionaron 400 μ L de una solución de PCI (25:24:1) de la marca SIGMA. Se agitó vigorosamente durante 30 segundos.
8. La mezcla se centrifugó a 19, 064 x g durante 10 min a 4 °C y se recuperó la fase acuosa que contenía el ADN. Esta se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL estéril. La fase orgánica se desechó y la extracción se repitió nuevamente, se centrifugó a 19, 064 x g durante 10 min a 4 °C.
9. Se llevaron a cabo dos pasos de lavado con cloroformo para eliminar las trazas de fenol y se centrifugó a 19, 064 x g durante 10 min a 4 °C para recuperar la fase acuosa mientras que la fase orgánica se desechó.
10. La fase acuosa colectada se centrifugó y se transfirió a un tubo limpio dos veces para eliminar los residuos de cloroformo.
11. Se adicionó 1.2 mL de etanol frío al 100 %, se agitó por inversión de 2 a 5 veces y se incubó a -20 °C durante toda la noche.
12. La mezcla se centrifugó a 19, 064 x g durante 10 min a 4 °C.
13. El pellet se lavó con 300 μ L de etanol al 75 % (v/v) y se centrifugó 19, 064 x g durante 2 min a 4 °C.
14. Se desechó el etanol y se dejó evaporar el remanente a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar.
15. El pellet se resuspendió en 100 μ L de agua grado biología molecular estéril 1 h.
16. Calentar a 70 °C durante 30 min.
17. Para eliminar los restos de fenol y cloroformo se utilizó la columna QIAquick de *QIAGEN*.

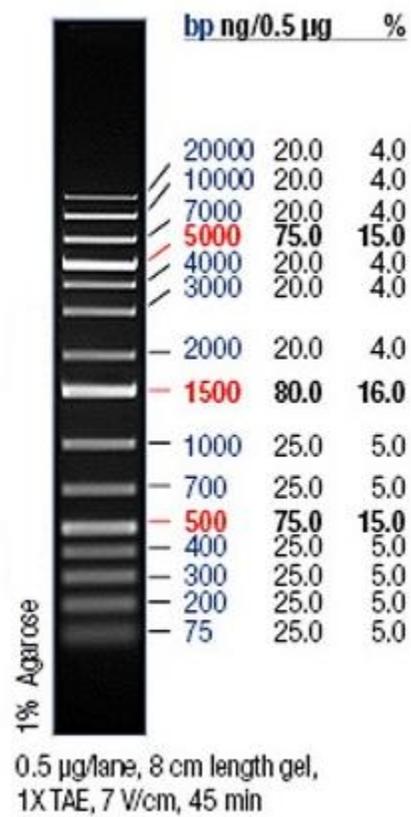
-
18. Se adicionó a cada tubo 3 volúmenes de buffer QG y 1 volumen de isopropanol.
 19. Se transfirió la solución a una columna QIAquick.
 20. Se centrifugó a 10 000 x g durante 1 min.
 21. Se descartó el líquido filtrado y se adicionaron 0.75 mL de buffer PE a la columna, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó a 10 000 x g durante 1 min.
 22. Se descartó el líquido filtrado y se centrifugó nuevamente a 10 000 x g durante 1 min.
 23. La columna se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se adicionaron 50 µL de agua grado biología molecular pH 8 a 65 °C, se incubó durante 5 min a 65 °C antes de centrifugar a 10 000 x g durante 1 min.
 24. Se realizó una segunda elución con 30 µL de agua grado biología molecular pH 8 a 65 °C, se incubó durante 5 min a 65 °C antes de centrifugar a 10 000 x g durante 1 min.
 25. Se almacenó a -20 °C.

11.6. Purificación de ADN con el kit QIAquick, QIAgen.

1. En el tubo con aproximadamente 100 µL de ADN, adicionar 300 µL de Buffer QG y 100 µL de isopropanol.
2. Transferir la mezcla a una columna QIAquick con un tubo colector de 2 mL y centrifugar durante un min a máx. velocidad.
3. Desechar el líquido colectado en el tubo.
4. Adicionar 500 µL de buffer QG y centrifugar nuevamente durante un min a máx. velocidad.
5. Desechar el líquido colectado en el tubo.
6. Adicionar 750 µL de buffer PE, esperar 5 min y centrifugar durante un min a máxima velocidad.
7. Desechar el líquido colectado en el tubo y centrifugar durante un min a máx. velocidad.
8. Pasar la columna QIAquick en un tubo para microcentrifuga de 2 mL, adicionar 50 µL de buffer EB precalentado a 65 °C, esperar por 5 min y centrifugar durante un min a máx. velocidad.
9. Desechar la columna y almacenar el ADN purificado a -20 °C.

11.7. Marcador de tamaño molecular

Thermo Scientific Gene Ruler 1kb Plus DNA ladder



11.8. Purificación de fragmentos de ADN a partir del gel de agarosa mediante el kit High Pure PCR Product Purification Roche

El procedimiento para extraer ADN a partir de 100 mg de gel de agarosa se describe a continuación:

1. Aislar los fragmentos de ADN del tamaño de interés electroforéticamente utilizando buffer de corrida TAE 1X o TBE 1X y la menor cantidad posible de bromuro de etidio (aprox. 1µL). Cargar el producto junto con un marcador de ADN.
2. Estimar la concentración del ADN mediante la comparación de su intensidad con la de un estándar de ADN de tamaño similar y concentración conocida.
3. Cortar la banda de ADN de interés del gel con un escalpelo afilado (cortar la menor cantidad de gel posible).
4. Colocar la banda de gel de agarosa en un tubo de microcentrífuga estériles (1,5 - 2,0 mL) y por diferencia de peso, calcular el peso del fragmento de agarosa.
5. Añadir 300 µL de Binding Buffer por cada 100 mg de gel de agarosa.
6. Disolver el gel de agarosa para liberar el ADN con ayuda del vórtex durante 15-30 segundos, posteriormente incubar a 56°C durante 10 min y agitar en vórtex cada 2 o 3 min.
7. Una vez que el gel se haya disuelto por completo, adicionar 150 µL de isopropanol frío por cada 100 mg de agarosa en el tubo y mezclar en vórtex vigorosamente.
8. Insertar uno de los tubos con filtro dentro de un tubo colector. Filtrar la mezcla de agarosa con isopropanol. (No adicionar más de 700µL, si la solución excede el volumen se recomienda utilizar dos filtros).
9. Centrifugar 60 segundos a máxima velocidad a una temperatura entre 15 y 25°C.
10. Desechar la fracción filtrada y adicionar 500µL de Wash Buffer al filtro y centrifugar 1 min a máxima velocidad.
11. Desechar nuevamente el líquido filtrado y adicionar 200 µL de Wash buffer y centrifugar 1 min a máxima velocidad.
12. Desechar el líquido filtrado nuevamente e insertar el tubo con filtro dentro de un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL.
13. Adicionar 50-100 µL de buffer de elución y centrifugar 3 min a máxima velocidad.
14. Desechar la columna y centrifugar 1 min a máxima velocidad.
15. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
16. Almacenar el ADN a -20°C para análisis posteriores.

11.9. Purificación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa mediante el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymoresearch).

1. Aislar los fragmentos de ADN del tamaño de interés electroforéticamente y cortar la banda de ADN de interés del gel con un escalpelo afilado (cortar la menor cantidad de gel posible).
2. Depositar la banda en un tubo de 1.5 mL estéril y determinar el peso por diferencia de volumen.
3. Adicionar 3 volúmenes de buffer ADB por cada volumen de agarosa.
4. Incubar a 55° por 10 min o hasta disolver completamente la agarosa. (Para fragmentos mayores a 8 kpb adicionar posterior a la incubación un volumen de agua).
5. Transferir la solución a una columna Zymo-Spin™ I dentro de un tubo colector.
6. Centrifugar a máxima velocidad por 1 min y desechar el líquido filtrado.
7. Adicionar 200 µL de wash buffer a la columna y centrifugar a máxima velocidad por 1 min. Desechar el líquido filtrado y repetir el paso.
8. Transferir la columna a un tubo estéril de 1.5 mL. Adicionar ≥ 6 µL de agua a 60-70°C y esperar un min.
9. Centrifugar a máxima velocidad por 1 min para eluir el ADN.

11.10. Protocolo de extracción de ADN a partir de geles de agarosa con tierra de diatomeas.

1. Correr el ADN en un gel de agarosa al 0.7% (p/v) en buffer Tris-Acetatos.
2. Cortar la banda de ADN deseada con una navaja lavada previamente con etanol al 70% (v/v) y esterilizada.
3. Colocar la banda en un tubo estéril de 2 mL y calcular el peso de la agarosa por diferencia de pesos.
4. Agregar 3 volúmenes de solución de sal caotrópica.
5. Incubar por 10 min a 50 °C para disolver la agarosa.
6. Adicionar 10 µL de glassmilk a la solución de agarosa si la concentración esperada es menor de 5µg e incubar a 4°C por 10 min y mezclar por inversión cada 30 segundos. Homogenizar previamente la solución de glassmilk.
7. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 min.
8. Retirar el sobrenadante y desecharlo cuidando de no arrastrar tierra de diatomeas en la solución.
9. Lavar 3 veces el pellet con 500 µL de new wash. Centrifugar cada vez a máxima velocidad durante 30 segundos.
10. Retirar todo el new wash y dejar evaporar el etanol a temperatura ambiente durante 10 min.
11. Para separar el ADN de la tierra de diatomeas agregar 20 µL de agua al pellet y resuspender e incubar 7 min a 55 °C.
12. Centrifugar a máxima velocidad durante un min.
13. Recuperar el sobrenadante y volver a centrifugar a máxima velocidad durante 10 min (repetir este paso).

14. Verificar la integridad en gel de agarosa y medir concentración.

Sal caotrópica (NaI)

89.94 g de NaI

5.0 mL de Tris-HCl 1M pH 8.0

4.0 mL de EDTA 0.25M pH 8.0

Ajustar la solución a 100 mL con agua grado biología molecular.

Solución New Wash 50% (v/v) etanol

20mM Tris. HCl pH 7.5

2mM EDTA pH 7.5

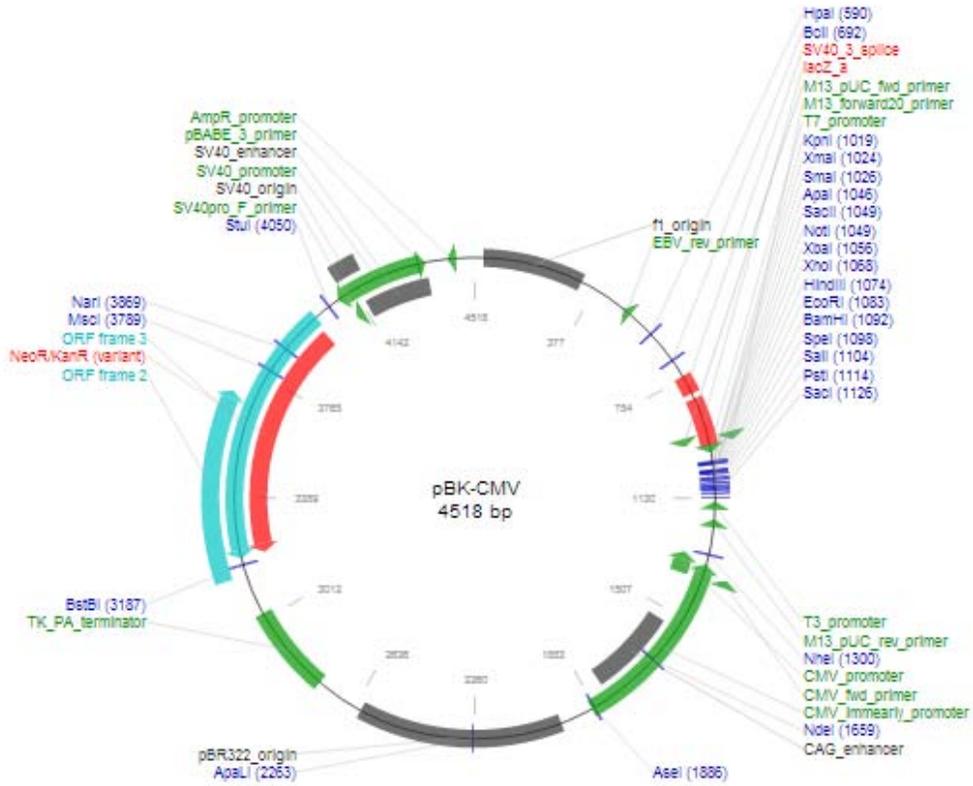
50 mM NaCl

Glassmilk - Disolver 50 mg en 200 μ L de agua.

11.11. QIAEX II Agarosa Gel Extraction Protocol – QIAgen

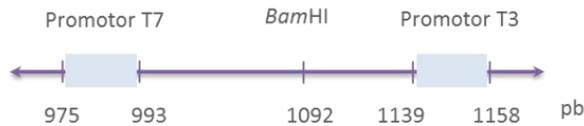
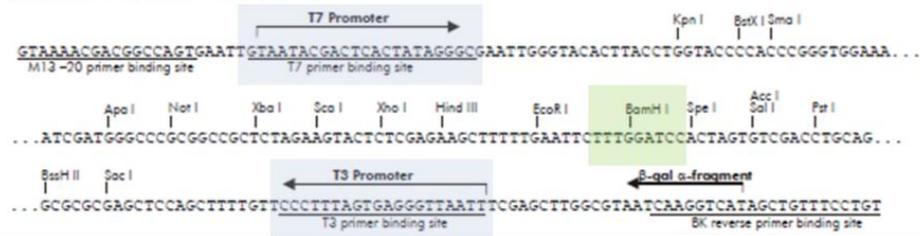
1. Aislar los fragmentos de ADN del tamaño de interés mediante electroforesis en agarosa bajo punto de fusión.
2. Cortar la banda de ADN de interés del gel con un escalpelo afilado (cortar la menor cantidad de gel posible).
3. Colocar la banda en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL
4. Calcular el peso de la banda por diferencia de peso con el tubo (se puede procesar 250 mg de agarosa como máximo por tubo de 1.5 mL).
5. Adicionar 3 volúmenes de buffer QX I y 2 volúmenes de agua grado biología molecular a cada tubo (ejemplo: si la banda pesa 250 mg, se agregan 750 μ L de buffer QX1 y 500 μ L de agua).
6. Agitar en vórtex la solución QIAEX II durante 30 segundos. Adicionar 10 μ L de QIAEX II a cada tubo.
7. Incubar la mezcla a 50 °C durante 10 min para solubilizar la agarosa. Durante la incubación, mezclar por inversión suave cada 2 min. Verificar que el color de la solución es amarillo. Si el color se torna de color naranja o morado adicionar 10 μ L de acetato de sodio 3 M pH 5.0 y mezclar.
8. Centrifugar la muestra a $\geq 10,000 \times g$ durante 30 segundos y remover el sobrenadante con una pipeta tratando de no tocar el paquete de sílice.
9. Lavar el pellet con 500 μ L de Buffer QX 1 tratando de no agitar fuerte.
10. Centrifugar la muestra a $\geq 10,000 \times g$ durante 30 segundos y remover el sobrenadante con una pipeta.
11. Lavar dos veces el pellet con 500 μ L de Buffer PE, no agitar fuerte.
12. Centrifugar la muestra a $\geq 10,000 \times g$ durante 30 segundos y remover el sobrenadante con una pipeta.

11.14. Fagémido pBK-CMV



<http://www.addgene.org/vector-database/1926/>

pBK-CMV Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 952-1196)



11.15. Medios de cultivo

A continuación se describe la composición de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento, infección y transformación de las cepas de *E. coli*.

* **Medio Luria-Bertani (LB).** Medio para el crecimiento y mantenimiento de las cepas de *E. coli*.

Bacto-triptona	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	10.0 g
Agua destilada completar hasta	1 L
Ajustar pH a 7.5	
Para medio sólido añadir	15.0 g/L de agar.

* **Medio LB con suplementos.** Medio para el crecimiento de las cepas de *E. coli* antes de la infección por fagos λ . Para 1 L de LB líquido estéril agregar:

1 M MgSO ₄	10.0 mL
20% (p/v) de maltosa	10.0 mL

* **Medio LB con kanamicina.** Medio para el crecimiento de la cepa *E. coli* XL0LR para realizar la escisión. Para 1 L de LB estéril, dejar enfriar a 55 °C y agregar:

10 mg/mL kan (filtrada)	7.5 mL
Poner en cajas de Petri.	

* **Medio LB con ampicilina.** Para 1 L de LB estéril, dejar enfriar a 55 °C y agregar ampicilina estéril a una concentración final de 100 μ g/mL.

* **Medio LB con tetraciclina.** Medio para el crecimiento y mantenimiento de las dos cepas de *E. coli*. Para 30 mL de LB estéril, dejar enfriar a 55 °C y agregar:

5 mg/mL tetraciclina (filtrada)	300 μ L
Poner en cajas de Petri lejos de la luz.	

* **Medio NZY.** Medio para la propagación de bacteriófagos λ .

NZY amina tipo A	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	5.0 g
MgCl ₂ •7H ₂ O	2.0 g
Agua destilada Completar hasta	1 L

Para medio sólido añadir 15 g/L de agar y 7.5 g/L para la sobre-capa de agar NZY.

11.16. Soluciones

* **IPTG 10mM**: disolver 0.6 g de IPTG solido en 250 mL de agua y esterilizar la solución por filtración en membrana de 0.25 micras.

* **Amortiguador SM**. Medio rico en Mg^{2+} para el almacenamiento de librerías en fagos λ .

NaCl	5.8 g
$MgCl_2 \cdot 7H_2O$	2.0 g
Tris-HCl 1M (pH 7.5)	50.0 mL
Grenetina 2% (p/v)	5.0 mL
Agua destilada completar hasta:	1 L.

Esterilizar en autoclave, almacenar a temperatura ambiente en alícuotas de 50 mL para evitar contaminación.

* **Amortiguador TBE** (Tris-Borate-EDTA) (10X). Solución utilizada en la electroforesis de gel de agarosa.

Tris base	107.81 g
EDTA	7.44 g
Ácido bórico	55.0 g
Agua destilada Ajustar a pH 8.0 y completar hasta 1L	

* **SDS 10% (p/v)**. Detergente desnaturizante para electroforesis de proteínas.

SDS	5g
Agua desionizada	50mL

11.17. Sustratos

* **Fast Blue RR** (80 mg/mL). Utilizado para la detección de actividad esterasa.

Fast Blue RR	80 mg
DMSO	1 mL
Almacenar a $-20^{\circ}C$	

* **Acetato de naftilo** (20 mg/mL). Utilizado para la detección de actividad esterasa.

Acetato de naftilo	20 mg
Acetona	1 mL
Almacenar a $-20^{\circ}C$	

* **pNP-butirato** (0.01 M). Utilizado como sustrato en las cinéticas con el biocatalizador.

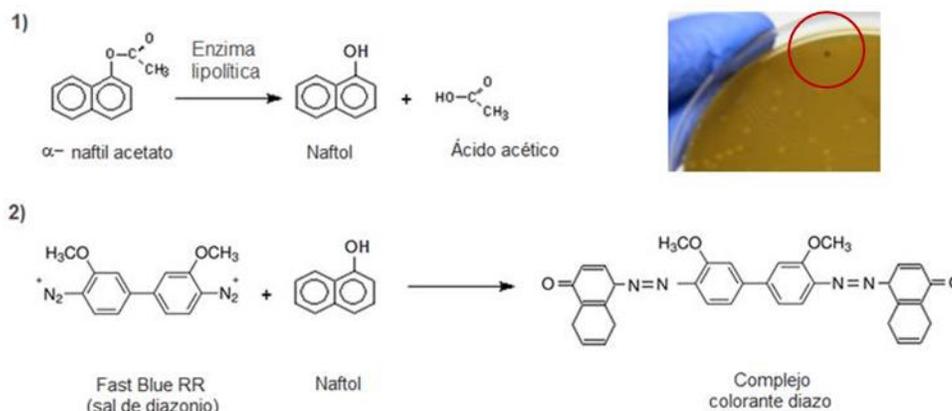
pNP-butirato	0.0175 mL
Isopropanol	10 mL

11.18. Cultivo de cepa *Escherichia coli* XL1-Blue MRF⁺ para infección.

La cepa *Escherichia coli* XL1-Blue MRF⁺ se encontraban almacenada en glicerol a -80 °C, por lo cual fue reactivada en una caja con medio LB con tetraciclina a una concentración final de 12.5 µg/mL e incubada a 37°C durante toda la noche. A partir de las colonias obtenidas se realizó un cultivo en medio líquido LB con suplementos (maltosa a una concentración final de 0.2 % (p/v) y sulfato de magnesio a una concentración final de 10 mM) hasta una $DO_{600nm} = 0.5$.

11.19. Identificación de clonas CEH positivas mediante hidrólisis de α -naftil ésteres

La técnica de identificación funcional de clonas con actividad CEH se fundamenta en que las enzimas CEH son capaces de hidrolizar el acetato de naftilo en naftol y ácido acético. En seguida, el naftol forma un complejo colorido con el reactivo Fast Blue RR (sal diazo de 4-benzoilamino-2,5-dimetoxi-anilina-ZnCl₂) y las clonas positivas se observan de color marrón sobre la placa de agar (Miller R., y Karn R., 1980).



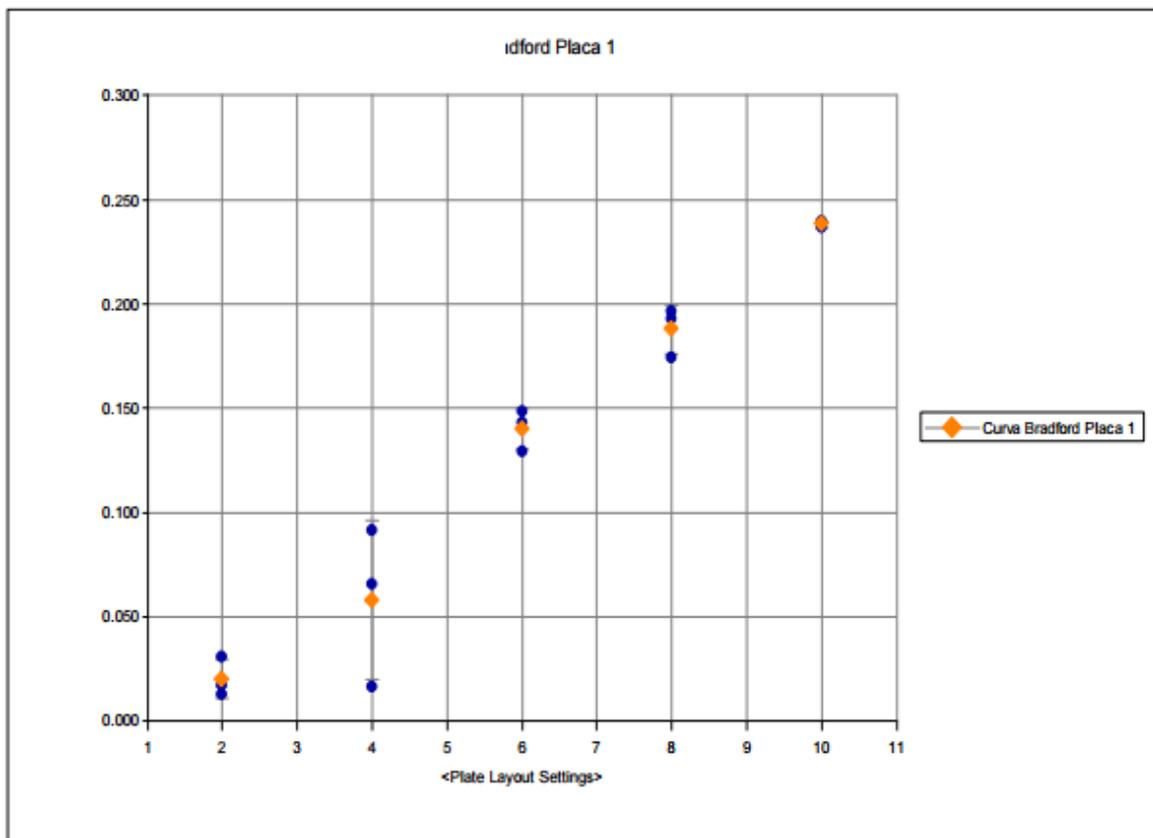
El protocolo a seguir para esta técnica es el siguiente:

- 1) Preparar al momento, 50 mL de agarosa 0.4 % (p/v) diluida en TAE 1X a 55°C que contenga 4 mL de acetato de naftilo en acetona (20 mg/mL) y 4 mL Fast-Blue RR en DMSO (80 mg/mL).
- 2) Verter aproximadamente 5-7 mL de la solución sobre las placas de agar de 100 mm que contengan UFC y/o UFP lo suficientemente separadas para ser diferenciadas y aisladas de otras en caso de que la reacción proceda.
- 3) Las UFP y/o UFC con actividad CEH deben tornarse de color marrón.

11.20. Protocolo de escisión del vector pBK-CMV

- 1) Se activaron las cepas *E. coli* XLOLR y *E. coli* XL1-Blue MRF' a partir de glicerol en medio LB agar con tetraciclina 12.5 µg/mL.
- 2) A partir de los cultivos anteriores se realizó un precultivo en 20 mL de caldo LB con 200 µL de maltosa al 20 % (p/v) y 200 µL de sulfato de magnesio 1 M, se incubó a 37 °C durante toda la noche.
- 3) Con el precultivo se inoculó un cultivo de 20 mL de caldo LB con suplementos (200 µL de maltosa al 20% (p/v) y 200 µL de sulfato de magnesio 1M) hasta alcanzar una D.O. _{600 nm} de 0.5-0.8. Se incubó a 37 °C a 250 rpm.
- 4) Se tomó una alícuota del cultivo de *E. coli* XLOLR o cultivo de *E. coli* XL1-Blue MRF' de aproximadamente 5 mL y se centrifugó para obtener el paquete celular. Se resuspendieron las células en 10 mM MgSO₄ hasta lograr una D.O. _{600 nm} de 1.0.
- 5) Posteriormente, se combinaron los siguientes componentes en un tubo para centrifuga de 50 mL.
 - 200 µL de *E. coli* XL1-Blue MRF' en 10 mM MgSO₄ D.O. _{600 nm} =1
 - 250 µL de fago seleccionado como positivo
 - 1 µL de fago ayudador (fago M13) (tener cuidado de no tomar cloroformo)
- 6) Se incubó el tubo a 37 °C durante 15 min.
- 7) Se adicionaron 3 mL de caldo LB con suplementos y se incubó por 3 horas a 37 °C con agitación a 150 rpm.
- 8) El tubo fue calentado a 70 °C durante 20 min.
- 9) Después, se centrifugó a 1000 x g durante 15 min.
- 10) El sobrenadante fue decantado en un tubo para centrifuga estéril para almacenarse a 4 °C por máximo 2 meses. (Esta solución contenía el fagémido pBK-CMV recombinante).
- 11) En tubos Eppendorf de 1.5 mL se adicionaron los siguientes elementos:
 - 10 µL de solución que contiene el fagémido
 - 200 µL de células *E. coli* XLOLR en 10 mM MgSO₄ D.O. _{600 nm} =1
- 12) Los tubos fueron incubados a 37 °C durante 15 min.
- 13) Se adicionaron 300 µL de caldo NZY.
- 14) Los tubos se incubaron a 37 °C durante 45 min y se platear 100 µL de la mezcla de células en platos de agar LB con kan (50 µg/mL), IPTG 1mM y tributirina al 1 % (v/v).
- 15) Finalmente se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

11.21. Curva patrón de albúmina bovina sérica para cuantificación de proteína por el método de Bradford.



Regresión lineal: $y = 0.0283x - 0.0407 \quad R^2 = 1$

11.22. Cálculo de la titulación de la biblioteca metagenómica del queso Cotija.

$$ufp \text{ totales} = \frac{(\text{promedio de } ufp)(1/\text{dilución de conteo})(\mu L \text{ totales de biblioteca})}{(\mu L \text{ de dilución empleados para la infección de las células})}$$

$$\begin{aligned} ufp \text{ totales} &= \frac{(55 \text{ ufp})(1/10^{-2})(498 \mu L)}{(2 \mu L)} \\ &= \mathbf{136,950 \text{ UFP totales en la biblioteca metagenómica}} \end{aligned}$$

Donde: el tamaño promedio de los fragmentos clonados es de 6 kpb.

$$\begin{aligned} 136,950 \text{ UFP} \times 6 \text{ kpb} &= 821\,700 \text{ kpb} \\ &= \mathbf{0.821 \text{ Gpb representados en la biblioteca metagenómica}} \end{aligned}$$

11.24. Alineamiento entre la secuencia obtenida por Primer Walking, Macrogen y la secuencia obtenida por diseño de primer.

Multalin version 5.4.1
 Copyright I.N.R.A. France 1989, 1991, 1994, 1996
 Published research using this software should cite
 Multiple sequence alignment with hierarchical clustering
 F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890
 Symbol comparison table: blosum62
 Gap weight: 12
 Gap length weight: 2
 Consensus levels: high=90% low=50%
 Consensus symbols:
 ! is anyone of IV
 \$ is anyone of LM
 % is anyone of FY
 # is anyone of NDQEBZ
 MSF: 3253 Check: 0 ..
 Name: clonaIdp Len: 3253 Check: 6385 Weight: 1.00
 Name: PwclonaI Len: 3253 Check: 9542 Weight: 1.00
 Name: Consensus Len: 3253 Check: 4688 Weight: 0.00

Clona Idp = Secuencia obtenida por diseño de primer y posteriores secuenciaciones.
 PwclonaI =Secuencia adquirida y ensamblada por el servicio Primer Walking, Macrogen.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
clonaIdp	GATCCACAAACCAAGTGTGTTAACCACTTCACCACTACCGCCATGGCAGGGATAGAGGGATCGARCCCCCACTCAGCGGTTTTGGAGCCGCTATTCTAC													
PwclonaI	AGTACTCTCGAGAGGCTTTTGAATCTTTGGATCCACAAACCAAGTGTGTTAACCACTTCACCACTACCGCCATGGCAGGGATAGAGGGATCGARCCCCCACTCAGCGGTTTTGGAGCCGCTATTCTAC													
ConsensusGATCCACAAACCAAGTGTGTTAACCACTTCACCACTACCGCCATGGCAGGGATAGAGGGATCGARCCCCCACTCAGCGGTTTTGGAGCCGCTATTCTAC													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
clonaIdp	CGTTTAACTATATCCCTAATACCTTAGCTCAGTCATAGACTGAATTAACATGGTGGGGAAATGCACCCACATTAACATGGCTTGACATGTTTGTGAGTAGTACTTTATAGCGGTCACAGCGGGG													
PwclonaI	CGTTTAACTATATCCCTAATACCTTAGCTCAGTCATAGACTGAATTAACATGGTGGGGAAATGCACCCACATTAACATGGCTTGACATGTTTGTGAGTAGTACTTTATAGCGGTCACAGCGGGG													
Consensus	CGTTTAACTATATCCCTAATACCTTAGCTCAGTCATAGACTGAATTAACATGGTGGGGAAATGCACCCACATTAACATGGCTTGACATGTTTGTGAGTAGTACTTTATAGCGGTCACAGCGGGG													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
clonaIdp	TCGARCCCGCGATCCTCGCTGACAGCGAGGGCTCTAACAGCTAGACCATGGACCAATGGACGCTACAGGGATCGARCTGTGACCCCTGCTTGTARAGCGGGTCTCCACGCTAGCTTAGC													
PwclonaI	TCGARCCCGCGATCCTCGCTGACAGCGAGGGCTCTAACAGCTAGACCATGGACCAATGGACGCTACAGGGATCGARCTGTGACCCCTGCTTGTARAGCGGGTCTCCACGCTAGCTTAGC													
Consensus	TCGARCCCGCGATCCTCGCTGACAGCGAGGGCTCTAACAGCTAGACCATGGACCAATGGACGCTACAGGGATCGARCTGTGACCCCTGCTTGTARAGCGGGTCTCCACGCTAGCTTAGC													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
clonaIdp	GTCATGATGGAGGGAGGGGATTCGARCCCTCGAGCAGATCCCTGCTTACACGGTTCCARCCGCTGCTCCTCGGCGAGACTCGGACACCTCCGATTAATCTTCTACTGCTCTACTCTCTTT													
PwclonaI	GTCATGATGGAGGGAGGGGATTCGARCCCTCGAGCAGATCCCTGCTTACACGGTTCCARCCGCTGCTCCTCGGCGAGACTCGGACACCTCCGATTAATCTTCTACTGCTCTACTCTCTTT													
Consensus	GTCATGATGGAGGGAGGGGATTCGARCCCTCGAGCAGATCCCTGCTTACACGGTTCCARCCGCTGCTCCTCGGCGAGACTCGGACACCTCCGATTAATCTTCTACTGCTCTACTCTCTTT													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
clonaIdp	CTATGTAGCGCCACATCGTCTTCTCCTCGAGGAGCGATCTCCACACTTCTTCCGGCTATAGAGCTTACTTCTGTGTTGGTATGGGACAGGTTGTGCTCTATGCTATCGACAGACACCTT													
PwclonaI	CTATGTAGCGCCACATCGTCTTCTCCTCGAGGAGCGATCTCCACACTTCTTCCGGCTATAGAGCTTACTTCTGTGTTGGTATGGGACAGGTTGTGCTCTATGCTATCGACAGACACCTT													
Consensus	CTATGTAGCGCCACATCGTCTTCTCCTCGAGGAGCGATCTCCACACTTCTTCCGGCTATAGAGCTTACTTCTGTGTTGGTATGGGACAGGTTGTGCTCTATGCTATCGACAGACACCTT													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
clonaIdp	GAGGTAGCCACTCAAACTAATAGTACAAATCTTCTTCTATCCTAACCACTCATATGCTTATCGAATTTCTATCCGTAGACTTTGGTARAGTCTCGACCTATTAGTACTAGTCCGCT													
PwclonaI	GAGGTAGCCACTCAAACTAATAGTACAAATCTTCTTCTATCCTAACCACTCATATGCTTATCGAATTTCTATCCGTAGACTTTGGTARAGTCTCGACCTATTAGTACTAGTCCGCT													
Consensus	GAGGTAGCCACTCAAACTAATAGTACAAATCTTCTTCTATCCTAACCACTCATATGCTTATCGAATTTCTATCCGTAGACTTTGGTARAGTCTCGACCTATTAGTACTAGTCCGCT													
	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
clonaIdp	CCATTGACTCACTCACTTCCACTTACGCTATCTACTCATCATCTCAGGGGCTTACTCTATTAAATAGATGGGAAATCTCATCTCGAGGCGAGTTCCACTTAGATGCTTTACGCGTTTATCTC													
PwclonaI	CCATTGACTCACTCACTTCCACTTACGCTATCTACTCATCATCTCAGGGGCTTACTCTATTAAATAGATGGGAAATCTCATCTCGAGGCGAGTTCCACTTAGATGCTTTACGCGTTTATCTC													
Consensus	CCATTGACTCACTCACTTCCACTTACGCTATCTACTCATCATCTCAGGGGCTTACTCTATTAAATAGATGGGAAATCTCATCTCGAGGCGAGTTCCACTTAGATGCTTTACGCGTTTATCTC													
	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
clonaIdp	ATCCATACATAGCTACCCAGCAATGCTCTGGCGAACAACCTGGTACACAGCGGATGTCATCCCGGCTCTCGTACTTAGGACAGCTCCTCTCAAAATTTCTCGCCCGGACCGATAGGACCGA													
PwclonaI	ATCCATACATAGCTACCCAGCAATGCTCTGGCGAACAACCTGGTACACAGCGGATGTCATCCCGGCTCTCGTACTTAGGACAGCTCCTCTCAAAATTTCTCGCCCGGACCGATAGGACCGA													
Consensus	ATCCATACATAGCTACCCAGCAATGCTCTGGCGAACAACCTGGTACACAGCGGATGTCATCCCGGCTCTCGTACTTAGGACAGCTCCTCTCAAAATTTCTCGCCCGGACCGATAGGACCGA													
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
clonaIdp	ACTGTCTCAGCGCTTCTGAACCCAGCTCGCGTACCGCTTATGGGGGACAGCCCAACCTTGGGACCGACTACAGCCCGAGGATCGGATGAGCGGACTCGAGTCCCAACCTCCCGCTCGATGG													
PwclonaI	ACTGTCTCAGCGCTTCTGAACCCAGCTCGCGTACCGCTTATGGGGGACAGCCCAACCTTGGGACCGACTACAGCCCGAGGATCGGATGAGCGGACTCGAGTCCCAACCTCCCGCTCGATGG													
Consensus	ACTGTCTCAGCGCTTCTGAACCCAGCTCGCGTACCGCTTATGGGGGACAGCCCAACCTTGGGACCGACTACAGCCCGAGGATCGGATGAGCGGACTCGAGTCCCAACCTCCCGCTCGATGG													

	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
cIonaIxp	GATCTTTGGGGGAGATGAGCCTGTATCCCCAGGGTAGCTTTTATCCGTTGAGCATGGCCCTCCATCGGAAACACCGGATCACATAGTCTACTTTCTGACTCGTGGTGTAGCTCTCGCATC													
PhcIonaI	GATCTTTGGGGGAGATGAGCCTGTATCCCCAGGGTAGCTTTTATCCGTTGAGCATGGCCCTCCATCGGAAACACCGGATCACATAGTCTACTTTCTGACTCGTGGTGTAGCTCTCGCATC													
Consensus	GATCTTTGGGGGAGATGAGCCTGTATCCCCAGGGTAGCTTTTATCCGTTGAGCATGGCCCTCCATCGGAAACACCGGATCACATAGTCTACTTTCTGACTCGTGGTGTAGCTCTCGCATC													
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
cIonaIxp	AAGCTTGGCTTATGCTTTTACACGCTACGATGATTTCCARCCATTCGAGCAACCTTGGAGCCCTCGGTACCTTTTGGAGGCGACCGCCCAAGTCAAACTGCCCCAGACATGTCACACGATC													
PhcIonaI	AAGCTTGGCTTATGCTTTTACACGCTACGATGATTTCCARCCATTCGAGCAACCTTGGAGCCCTCGGTACCTTTTGGAGGCGACCGCCCAAGTCAAACTGCCCCAGACATGTCACACGATC													
Consensus	AAGCTTGGCTTATGCTTTTACACGCTACGATGATTTCCARCCATTCGAGCAACCTTGGAGCCCTCGGTACCTTTTGGAGGCGACCGCCCAAGTCAAACTGCCCCAGACATGTCACACGATC													
	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
cIonaIxp	GTTGAGTGACCGTGTAGATGTTCTATACACGAGGGTAGATCCACCCGTCGACCTCCAGCTAGACTAGGCTCCATCTTCTACGCTCTCCACCTATTCGTACAGCAGCACAACATTCATATCA													
PhcIonaI	GTTGAGTGACCGTGTAGATGTTCTATACACGAGGGTAGATCCACCCGTCGACCTCCAGCTAGACTAGGCTCCATCTTCTACGCTCTCCACCTATTCGTACAGCAGCACAACATTCATATCA													
Consensus	GTTGAGTGACCGTGTAGATGTTCTATACACGAGGGTAGATCCACCCGTCGACCTCCAGCTAGACTAGGCTCCATCTTCTACGCTCTCCACCTATTCGTACAGCAGCACAACATTCATATCA													
	1561	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690
cIonaIxp	AGCTACAGTAAAGCTCCATGGGGTCTTCCGCTCTGCGGGTAGCCGATCTCCAGGGATTTAAATTTCAACGAGTCCCTCGTGGAGAGTCCAGATCGTACGCTTTCGTGGGGTCCGA													
PhcIonaI	AGCTACAGTAAAGCTCCATGGGGTCTTCCGCTCTGCGGGTAGCCGATCTCCAGGGATTTAAATTTCAACGAGTCCCTCGTGGAGAGTCCAGATCGTACGCTTTCGTGGGGTCCGA													
Consensus	AGCTACAGTAAAGCTCCATGGGGTCTTCCGCTCTGCGGGTAGCCGATCTCCAGGGATTTAAATTTCAACGAGTCCCTCGTGGAGAGTCCAGATCGTACGCTTTCGTGGGGTCCGA													
	1691	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
cIonaIxp	ACTTACCCGACAGGAAATTCGCTACCTTAGGACCGTATAGTTACGGCCGCGTTTACTGGGGTTCATTCGACTTCCGCCAGCTAGACCTCTTTTAACTTCCAGCACCGGACGGCTCAG													
PhcIonaI	ACTTACCCGACAGGAAATTCGCTACCTTAGGACCGTATAGTTACGGCCGCGTTTACTGGGGTTCATTCGACTTCCGCCAGCTAGACCTCTTTTAACTTCCAGCACCGGACGGCTCAG													
Consensus	ACTTACCCGACAGGAAATTCGCTACCTTAGGACCGTATAGTTACGGCCGCGTTTACTGGGGTTCATTCGACTTCCGCCAGCTAGACCTCTTTTAACTTCCAGCACCGGACGGCTCAG													
	1821	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950
cIonaIxp	CCCCATACCTCATCTACGATTTGCGAARACCTGTGTTTTGATAAACAGTCGCTGGGCCATTCACCTGCGGCTCATGTTTTACCATGAGCACCCCTTCCCGAGATTAAGGGTCAATTTGCCGA													
PhcIonaI	CCCCATACCTCATCTACGATTTGCGAARACCTGTGTTTTGATAAACAGTCGCTGGGCCATTCACCTGCGGCTCATGTTTTACCATGAGCACCCCTTCCCGAGATTAAGGGTCAATTTGCCGA													
Consensus	CCCCATACCTCATCTACGATTTGCGAARACCTGTGTTTTGATAAACAGTCGCTGGGCCATTCACCTGCGGCTCATGTTTTACCATGAGCACCCCTTCCCGAGATTAAGGGTCAATTTGCCGA													
	1951	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080
cIonaIxp	GTTCTTAAAGGAGGGTCTCTCGCTACCTTAGTGTCTCCACCTGACTTACTGCTGGTGGTGGGACGGGAGTAAATCTTCCAGAGCTTTCTGGGACGTGACGCTTCAGACTTCTCTAC													
PhcIonaI	GTTCTTAAAGGAGGGTCTCTCGCTACCTTAGTGTCTCCACCTGACTTACTGCTGGTGGTGGGACGGGAGTAAATCTTCCAGAGCTTTCTGGGACGTGACGCTTCAGACTTCTCTAC													
Consensus	GTTCTTAAAGGAGGGTCTCTCGCTACCTTAGTGTCTCCACCTGACTTACTGCTGGTGGTGGGACGGGAGTAAATCTTCCAGAGCTTTCTGGGACGTGACGCTTCAGACTTCTCTAC													
	2081	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	2210
cIonaIxp	TTTATTCGATCCGATCAGCTGTGCTTATAGAAAAGGATTCACCTTTTACAGACTTACGCTTGCACGACATATCCATCAGTGGCARTCGGATCTTCCGCTCCCTCCATCGATATA													
PhcIonaI	TTTATTCGATCCGATCAGCTGTGCTTATAGAAAAGGATTCACCTTTTACAGACTTACGCTTGCACGACATATCCATCAGTGGCARTCGGATCTTCCGCTCCCTCCATCGATATA													
Consensus	TTTATTCGATCCGATCAGCTGTGCTTATAGAAAAGGATTCACCTTTTACAGACTTACGCTTGCACGACATATCCATCAGTGGCARTCGGATCTTCCGCTCCCTCCATCGATATA													
	2211	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310	2320	2330	2340
cIonaIxp	AGCATTACACCTGGTACAGGATCTCACCCTGTTATCCATCGACTAGCTTCTCAGCTCGCCTTAGGTCGGCARTACCTGGGTTGGACGAGCTTCCCGAGAACCTTAGTCACTGGTGGACGAG													
PhcIonaI	AGCATTACACCTGGTACAGGATCTCACCCTGTTATCCATCGACTAGCTTCTCAGCTCGCCTTAGGTCGGCARTACCTGGGTTGGACGAGCTTCCCGAGAACCTTAGTCACTGGTGGACGAG													
Consensus	AGCATTACACCTGGTACAGGATCTCACCCTGTTATCCATCGACTAGCTTCTCAGCTCGCCTTAGGTCGGCARTACCTGGGTTGGACGAGCTTCCCGAGAACCTTAGTCACTGGTGGACGAG													
	2341	2350	2360	2370	2380	2390	2400	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470
cIonaIxp	ATTCACCTGTCTTTCGCTACTCATACGGGATCTCAGTTGTAAGGCTCCAGGAGCTTACGATCAGCTTCTGCTCGCCTTACAGCCTCTCTTATCGGACATACGCTGACCCGAGTTCGGT													
PhcIonaI	ATTCACCTGTCTTTCGCTACTCATACGGGATCTCAGTTGTAAGGCTCCAGGAGCTTACGATCAGCTTCTGCTCGCCTTACAGCCTCTCTTATCGGACATACGCTGACCCGAGTTCGGT													
Consensus	ATTCACCTGTCTTTCGCTACTCATACGGGATCTCAGTTGTAAGGCTCCAGGAGCTTACGATCAGCTTCTGCTCGCCTTACAGCCTCTCTTATCGGACATACGCTGACCCGAGTTCGGT													
	2471	2480	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600
cIonaIxp	AATATGTTTACCCCGGATATTTCCGCGAATGGACCTCAGCTAGTAGGATTAACGACCTTTAAATGGTGGCTGCTTACAGCAGATCTCAGTGTGCTATGACATCAGCTGTTTCCACT													
PhcIonaI	AATATGTTTACCCCGGATATTTCCGCGAATGGACCTCAGCTAGTAGGATTAACGACCTTTAAATGGTGGCTGCTTACAGCAGATCTCAGTGTGCTATGACATCAGCTGTTTCCACT													
Consensus	AATATGTTTACCCCGGATATTTCCGCGAATGGACCTCAGCTAGTAGGATTAACGACCTTTAAATGGTGGCTGCTTACAGCAGATCTCAGTGTGCTATGACATCAGCTGTTTCCACT													
	2601	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700	2710	2720	2730
cIonaIxp	TAACTATATTTAGGGACCTTAACTGGGATCTGGGCTGTTCCTTTCCAGCGTGGATTTATCCTCATCGCTGACTCCCATCATACATATCGGATTCGGGATTTATCAAACTTTGGTAAACCG													
PhcIonaI	TAACTATATTTAGGGACCTTAACTGGGATCTGGGCTGTTCCTTTCCAGCGTGGATTTATCCTCATCGCTGACTCCCATCATACATATCGGATTCGGGATTTATCAAACTTTGGTAAACCG													
Consensus	TAACTATATTTAGGGACCTTAACTGGGATCTGGGCTGTTCCTTTCCAGCGTGGATTTATCCTCATCGCTGACTCCCATCATACATATCGGATTCGGGATTTATCAAACTTTGGTAAACCG													
	2731	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800	2810	2820	2830	2840	2850	2860
cIonaIxp	AGATGGGCCCCTAGGCTTAAACAGTCTTACCTCCAGATGCTTATATAGGGTAGCCCTAAAGCTATTTCCGAGAGAACCGATATCCAGCTCGTGTGGAAATTCACCGCTACCCACAGTTCATC													
PhcIonaI	AGATGGGCCCCTAGGCTTAAACAGTCTTACCTCCAGATGCTTATATAGGGTAGCCCTAAAGCTATTTCCGAGAGAACCGATATCCAGCTCGTGTGGAAATTCACCGCTACCCACAGTTCATC													
Consensus	AGATGGGCCCCTAGGCTTAAACAGTCTTACCTCCAGATGCTTATATAGGGTAGCCCTAAAGCTATTTCCGAGAGAACCGATATCCAGCTCGTGTGGAAATTCACCGCTACCCACAGTTCATC													
	2861	2870	2880	2890	2900	2910	2920	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990
cIonaIxp	CGAGCATTTTAAACATGACCCGGTCCGACCTCCAGTAGTTTACCTCACCCTCATCTGACCATGGTAGGTCATCGGTTCCGGTCTACAGCATGCTATTCGCGCTTACACATCGCTTTC													
PhcIonaI	CGAGCATTTTAAACATGACCCGGTCCGACCTCCAGTAGTTTACCTCACCCTCATCTGACCATGGTAGGTCATCGGTTCCGGTCTACAGCATGCTATTCGCGCTTACACATCGCTTTC													
Consensus	CGAGCATTTTAAACATGACCCGGTCCGACCTCCAGTAGTTTACCTCACCCTCATCTGACCATGGTAGGTCATCGGTTCCGGTCTACAGCATGCTATTCGCGCTTACACATCGCTTTC													
	2991	3000	3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	3080	3090	3100	3110	3120
cIonaIxp	GCTGCGGCTCCGGTCTTCCACTTAACTCGACATACCGTAACTCGCCGGTTCATCTACAAAAGGACGCGCATACCCATTAACGGGCTGACTTCTTGTAGGGCTCGTGGTTTCAGGAATATT													
PhcIonaI	GCTGCGGCTCCGGTCTTCCACTTAACTCGACATACCGTAACTCGCCGGTTCATCTACAAAAGGACGCGCATACCCATTAACGGGCTGACTTCTTGTAGGGCTCGTGGTTTCAGGAATATT													
Consensus	GCTGCGGCTCCGGTCTTCCACTTAACTCGACATACCGTAACTCGCCGGTTCATCTACAAAAGGACGCGCATACCCATTAACGGGCTGACTTCTTGTAGGGCTCGTGGTTTCAGGAATATT													
	3121	3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190	3200	3210	3220	3230	3240	3250
cIonaIxp	TCATCCCTTCCGGGGTCTTTCACCTTTCCTCACGGTACTGGTCACTACGCTAGGGAGTATTAGCCTTACGGGATGGTCCCGAGATTCGACGGATTTCAGCTGTCCGGCTACT													
PhcIonaI	TCATCCCTTCCGGGGTCTTTCACCTTTCCTCACGGTACTGGTCACTACGCTAGGGAGTATTAGCCTTACGGGATGGTCCCGAGATTCGACGGATTTCAGCTGTCCGGCTACT													
Consensus	TCATCCCTTCCGGGGTCTTTCACCTTTCCTCACGGTACTGGTCACTACGCTAGGGAGTATTAGCCTTACGGGATGGTCCCGAGATTCGACGGATTTCAGCTGTCCGGCTACT													
	3251	3260	3270	3280	3290	3300	3310	3320	3330	3340	3350	3360	3370	3380
cIonaIxp	TCATCCCTTCCGGGGTCTTTCACCTTTCCTCACGGTACTGGTCACTACGCTAGGGAGTATTAGCCTTACGGGATGGTCCCGAGATTCGACGGATTTCAGCTGTCCGGCTACT													
PhcIonaI	TCATCCCTTCCGGGGTCTTTCACCTTTCCTCACGGTACTGGTCACTACGCTAGGGAGTATTAGCCTTACGGGATGGTCCCGAGATTCGACGGATTTCAGCTGTCCGGCTACT													
Consensus	TCATCCCTTCCGGGGTCTTTCACCTTTCCTCACGGTACTGGTCACTACGCTAGGGAGTATTAGCCTTACGGGATGGTCCCGAGATTCGACGGATTTCAGCTGTCCGGCTACT													
	3381	3390	3400	3410	3420	3430	3440	3450	3460	3470	3480	3490	3500	3510
cIonaIxp	TCATCCCTTCCGGGGTCTTTCACCTTTCCTCACGGTACTGGTCACTACGCTAGGGAGTATTAGCCTTACGGGATGGTCCCGAGATTCGACGGATTTCAGCTGTCCGGCTACT													
PhcIonaI	TCATCCCTTCCGGGGTCTTTCACCTTTCCTCACGGTACTGGTCACTACGCTAGGGAGTATTAGCCTTACGGGATGGTCCCGAGATTCGACGGATTTCAGCTGTCCGGCTACT													
Consensus	TCATCCCTTCCGGGGTCTTTCACCTTTCCTCACGGTACTGGTCACTACGCTAGGGAGTATTAGCCTTACGGGATGGTCCCGAGATTCGACGGATTTCAGCTGTCCGGCTACT													

	A	C	F	G	H
C	Needle_Length: 6474 Identidad: 29.3%, Similitud: 29.3%, Gaps: 63.7%, Score: 3240.0 Water_Length: 4507 Identidad: 42% Similitud: 42%, Gaps: 47.7%, Score: 3243.5				
F	Needle_Length: 4333 Identidad: 41.9%, Similitud: 41.9%, Gaps: 47.2%, Score: 3004.0 Water_Length: 4320 Identidad: 42% Similitud: 42%, Gaps: 47.7%, Score: 3005.5	Needle_Length: 6669 Identidad: 39.8%, Similitud: 39.8 %, Gaps: 49.4%, Score: 4505.0 Water_Length: 6202 Identidad: 42.7% Similitud: 42.7 %, Gaps: 45.6%, Score: 4509.0			
G	Needle_Length: 3297 Identidad: 47.4%, Similitud: 47.4%, Gaps: 39.7%, Score: 2789.5 Water_Length: 3274 Identidad: 47.7% Similitud: 47.7%, Gaps: 39.2%, Score: 2789.5	Needle_Length: 6357 Identidad: 29.5%, Similitud: 29.5%, Gaps: 63.0%, Score: 3151.5 Water_Length: 4808 Identidad: 39.1% Similitud: 39.1%, Gaps: 51.0%, Score: 3151.5	Needle_Length: 4303 Identidad: 40.1%, Similitud: 40.1%, Gaps: 48.9%, Score: 2959.0 Water_Length: 4155 Identidad: 41.5% Similitud: 41.5%, Gaps: 47.0%, Score: 2961.0		
H	Needle_Length: 4112 Identidad: 43.6%, Similitud: 43.6%, Gaps: 45.7%, Score: 3293.0 Water_Length: 4107 Identidad: 43.7% Similitud: 43.7%, Gaps: 45.8%, Score: 3293.0	Needle_Length: 6606 Identidad: 38.1%, Similitud: 38.1%, Gaps: 52.2%, Score: 4380.0 Water_Length: 5885 Identidad: 42.7% Similitud: 42.7%, Gaps: 46.3%, Score: 4384.0	Needle_Length: 4814 Identidad: 44.7%, Similitud: 44.7%, Gaps: 43.0%, Score: 3786.5 Water_Length: 4780 Identidad: 45.0% Similitud: 45.0%, Gaps: 42.6 %, Score: 3786.5	Needle_Length: 4044 Identidad: 43.3%, Similitud: 43.4%, Gaps: 46.0%, Score: 3223.5 Water_Length: 4003 Identidad: 43.9% Similitud: 43.9%, Gaps: 45.3%, Score: 3227.5	
J	Needle_Length: 3889 Identidad: 39.9%, Similitud: 39.9%, Gaps: 47.7%, Score: 2164.0 Water_Length: 3614 Identidad: 42.6% Similitud: 42.6%, Gaps: 43.9%, score: 2175.0	Needle_Length: 6812 Identidad: 28.9%, Similitud: 28.9%, Gaps: 62.8%, Score: 2803.5 Water_Length: 4897 Identidad: 40.2% Similitud: 40.2%, Gaps: 48.3%, Score: 2811.5	Needle_Length: 4716 Identidad: 40.4%, Similitud: 40.4%, Gaps: 48.6 %, Score: 2745.0 Water_Length: 4453 Identidad: 42.8% Similitud: 42.8%, Gaps: 45.6%, Score: 2749.0	Needle_Length: 3857 Identidad: 40.3%, Similitud: 40.3%, Gaps: 49.4%, Score: 2123.5 Water_Length: 3672 Identidad: 41.7% Similitud: 41.7%, Gaps: 46.8%, Score: 2129.5	Needle_Length: 4579 Identidad: 38%, Similitud: 38%, Gaps: 50.1%, Score: 2256.5 Water_Length: 4366 Identidad: 39.9 % Similitud: 39.9%, Gaps: 47.2%, Score: 2261.0

11.26. Cartel presentado en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Guadalajara, Jalisco, México 2015.



Elaboración de un banco metagenómico del queso Cotija e identificación de esterasas

Ingrid Torres-Rodríguez^a, Carlos M. Díaz-Vega, Rafael E. Hernández-Pérez, Carolina Peña Montes^a, Dolores Reyes-Duarte^b y Maricarmen Quirasco Baruch^a.

^a Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. Química, Depto. Alimentos y Biotecnología, Cd. Universitaria, 04510, D.F. México. quirabma@unam.mx, Tel. (55) 5622-5305.

^b Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Depto. Procesos y Tecnología, México, D.F. 05348.

Introducción

Las bibliotecas metagenómicas son herramientas que exploran la información genética de organismos tanto cultivables como no cultivables de un hábitat.¹ El queso Cotija es un producto lácteo tradicional mexicano que se elabora con leche bronca, sin algún tratamiento térmico, y que por sus características fisicoquímicas permite el desarrollo de ciertos grupos microbianos, por lo que resulta un hábitat atractivo de estudio.

Investigaciones anteriores en el grupo de trabajo han permitido aislar e identificar varios microorganismos lipolíticos. Sin embargo, no se ha explorado en su totalidad la capacidad esterasa de las bacterias del queso Cotija.^{2,3} El objetivo de este trabajo fue elaborar una biblioteca metagenómica del queso Cotija y hacer un escrutinio para buscar hidrolasas de ésteres carboxílicos.

Posteriormente, en las 13 clonas se determinó cualitativamente la actividad hidrolítica intra y extracelular en un ensayo en líquido contra α -naftil acetato. En la figura 2 se muestra que las clonas A, C, F, G, H e I sobresalen por su actividad intracelular.

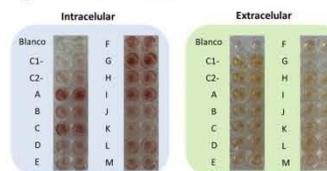
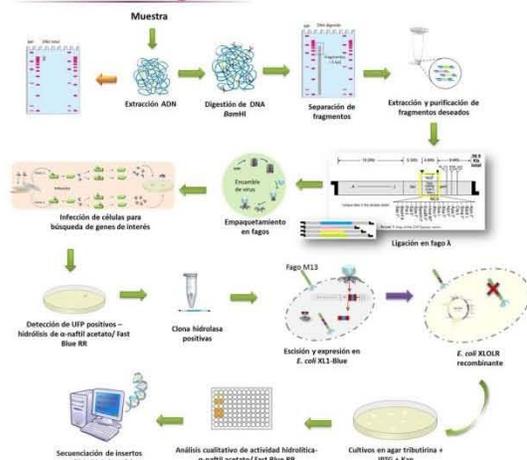


Fig. 2. Actividad hidrolítica intra y extracelular contra α -naftil acetato y Fast red.

Metodología



Resultados y discusión

Se construyó una biblioteca metagenómica que contiene 136,950 UFP, con un tamaño de inserto promedio de 5 kpb, por lo que el tamaño de la biblioteca es aproximadamente de 0.685 Gpb. La biblioteca se amplificó a 22.65 Gpb. El análisis funcional de esterasas permitió el aislamiento de 13 clonas de aproximadamente 100,000 analizadas. En la Figura 1 se muestra la capacidad de hidrólisis de α -naftil acetato y de tributirina de algunas de las clonas.

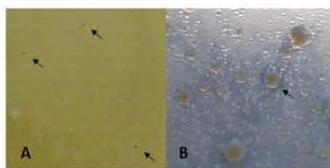


Fig. 1. (A) Ejemplo de las UFP seleccionadas por hidrólisis α -naftil / Fast Blue RR. (B) Confirmación de actividad esterasa en agar tributirina.

Los insertos de las clonas que presentaron mayor actividad, ya mencionadas, fueron secuenciados y se buscaron marcos de lectura abiertos (ORF) mediante GENEMARK para procariontes. Las secuencias codificantes fueron alineadas en la base de datos no redundante en el NCBI, base de datos de proteínas UniProt y bases de datos para esterasas (LED) (Tabla 1).

Tabla 1. Tabla de anotación de ORF predichos para los insertos de las clonas.

Clona	Proteína similar (No. de aa)	E-value	Identidad	Probable microorganismo de procedencia
A	Ferredoxina (368 aa)	0.0	99%	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>
	Oxidoreductasa (266 aa)	0.0	99%	
	Proteína de la familia de las Integrasas (405 aa)	0.0	100%	
C	Proteína hipotética (306 aa)	1e-149	99%	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>
F	Transportador de hierro tipo-ABC (221 aa)	2e-82	76%	<i>Corynebacterium glyciniphilum</i>
G	Proteína hipotética (68 aa)	4e-25	81%	<i>Kocuria rhizophila</i>
H	Fosforibosilamina-glicina ligasa (430 aa)	0.0	71%	<i>Kocuria marina</i>
I	Proteína hipotética (78 aa)	3e-47	99%	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

Las proteínas señaladas provienen de microorganismos identificados por secuenciación masiva del metagenoma del queso Cotija.

Conclusiones

Se lograron identificar algunas proteínas que si bien hidrolizan α -naftil acetato y tributirina no son hidrolasas; por lo que existe la posibilidad de que se trate de enzimas con actividad promiscua. La exploración de la capacidad esterasa de la microbiota del queso Cotija a través de la elaboración de un banco metagenómico permitió la identificación de nuevas enzimas con un potencial de aplicación en alimentos.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado por PAPIIT IN218613 DGAPA-UNAM. Ingrid Torres es alumna del Posgrado en Ciencias Bioquímicas y recibió beca de CONACyT.

Bibliografía

- Ferrer M., Chernikova T., Timmis K., Golyshin P. (2004) *Appl Environ Microbiol.* 70 (8):4499-4504.
- García V. (2006). Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM.
- García V. (2011). Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.