



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN DE ESTERASAS EN  
UNA BIBLIOTECA METAGENÓMICA  
OBTENIDA DEL QUESO COTIJA  
ARTESANAL MADURADO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**EDGAR RAFAEL HERNÁNDEZ PÉREZ**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.**

**2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**JURADO DE EXAMEN ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

**VOCAL:** Dr. Alfonso Rafael Salgado Aguayo

**SECRETARIO:** Dra. Carmina Montiel Pacheco

**1er SUPLENTE:** Dra. Francisca Morayna Gutiérrez Luna

**2° SUPLENTE:** Dra. Sara Margarita Garza Aguilar

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología en el Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México.

Se reconoce el apoyo recibido por el proyecto DGAPA PAPIIT IN222115: "Análisis Funcional del Metagenoma Bacteriano e Inocuidad y Potencial Biotecnológico del Género *Enterococcus* del Queso Cotija", junto con el Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP-FQ) con la clave 5000-9102.

---

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

**Asesora del Tema**

---

Dra. Carolina Peña Montes

**Supervisora Técnica**

---

Edgar Rafael Hernández Pérez

**Sustentante**

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Índice de Figuras	3
Índice de Tablas	4
Introducción	5
1. Marco Teórico	6
1.1 Queso Cotija	6
1.1.1 Zona geográfica y sus recursos específicos	6
1.1.2 Proceso de elaboración	7
1.2 Enzimas	10
1.2.1 Hidrolasas	11
1.2.2 Carboxilesterasas	11
1.2.3 Lipasas	12
1.2.4 Esterasas	12
1.2.5 Estructura y mecanismo catalítico de las esterases	13
1.2.6 Aplicación e importancia de las hidrolasas en la industria alimentaria	15
1.2.7 Actividades enzimáticas importantes durante la maduración de quesos.	16
1.2.8 Factores que afectan la velocidad de las reacciones enzimáticas	17
1.3 Biblioteca Metagenómica	19
1.3.1 Construcción de una biblioteca metagenómica	20
2. Antecedentes	21
3. Justificación	23
4. Hipótesis	24
5. Objetivos	24
5.1 Objetivo General	24
5.2 Objetivos Particulares	24
6. Metodología	25
6.1 Desarrollo experimental.	25
6.2 Clonas seleccionadas a partir de la biblioteca metagenómica.	25
6.3 Reactivación de clonas.	26
6.4 Verificación de actividad enzimática en cajas Petri.	26
6.5 Obtención de las fracciones celulares para cada clona.	26
6.6 Cuantificación de la concentración de proteína en las fracciones celulares.	27
6.7 Evaluación cualitativa de la actividad enzimática en las fracciones celulares.	27
6.8 Determinación del peso molecular y evaluación de la actividad enzimática en zimograma.	27
6.9 Determinación de especificidad por sustrato, pH y temperaturas óptimas.	28
7. Resultados y Discusión	30
7.1 Determinación de la actividad enzimática en cajas Petri.	30
7.2 Cuantificación de proteína en los contenidos celulares.	31
7.3 Evaluación de la actividad enzimática cualitativa en placa.	32
7.4 Determinación del peso molecular y evaluación de actividad enzimática en zimogramas.	33
7.5 Determinación de especificidad por sustrato, pH y temperaturas óptimas de los contenidos intracelulares.	35
7.5.1 Especificidad por sustrato	35
7.5.2 Efecto del pH sobre la actividad enzimática	38
7.5.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	41
8. Conclusiones.	44
9. Perspectivas.	45
10. Bibliografía.	46
11. Anexos.	52
11.1 Preparación de reactivos y medios de cultivo.	52
11.2 Curvas Patrón.	62
11.3 Cálculo de la actividad enzimática.	67
11.4 Análisis estadístico.	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1.1. Zona de producción del queso Cotija “Región de Origen”.	7
1.2. Etapas del proceso de elaboración del queso Cotija.	9
1.3. Ejemplo de una reacción de hidrólisis del enlace éster.	11
1.4. Acción catalítica de las lipasas.	12
1.5. Representación esquemática del plegamiento $\alpha/\beta$ hidrolasa.	13
1.6. Mecanismo de hidrólisis de las $\alpha/\beta$ hidrolasa en el sitio activo.	14
1.7. Protocolo de construcción de una biblioteca metagenómica de una muestra en general.	20
1.8. Esquema general de la elaboración de la biblioteca metagenómica del queso Cotija artesanal madurado.	22
2.1. Diagrama de la metodología general desarrollado en este proyecto.	25
7.1. Demostración de la actividad esterasa en el medio de cultivo con tributirina al 1%.	30
7.2. Demostración de la actividad esterasa en el medio de cultivo con aceite de olivo al 1%.	30
7.3. Actividad en placa con los reveladores <i>Fast Red</i> y <i>Fast Blue</i> de las clonas estudiadas.	32
7.4. Actividad en placa con el revelador <i>FastRed</i> de las clonas seleccionadas.	33
7.5. Gel desnaturalizante Coomassie-Zimograma de la clona G.	35
7.6. Gel desnaturalizante Coomassie-Zimograma de la clona I.	34
7.7. Actividad relativa de la enzima en la fracción intracelular de la clona G hacia diferentes sustratos.	35
7.8. Actividad relativa de la enzima en la fracción intracelular de la clona I hacia diferentes sustratos.	36
7.9. Comparación de la actividad relativa a diferentes valores de pH en la fracción intracelular de la clona G.	38
7.10. Comparación de la actividad relativa a diferentes valores de pH en la fracción intracelular de la clona I.	39
7.11. Comparación de la actividad relativa de la fracción intracelular de la clona G a diferentes valores de temperatura.	41
7.12. Comparación de la actividad relativa de la fracción intracelular de la clona I a diferentes valores de temperatura.	42

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
1.1. Utilización de enzimas en el procesamiento de alimentos.	15
1.2. Algunas propiedades y aplicaciones de las esterasas comerciales.	16
7.1. Resultados obtenidos de la actividad observada en el medio de cultivo con tributirina.	31
7.2. Concentración de proteína en el contenido intracelular de cada clona estudiada.	31
7.3. Actividad Específica de la enzima en el contenido intracelular de la clona G con diferentes sustratos.	35
7.4. Actividad Específica de la enzima en el contenido intracelular de la clona I con diferentes sustratos.	36
7.5. Actividad Específica de la enzima en el contenido intracelular de la clona G a diferentes valores de pH.	38
7.6. Actividad Específica de la enzima en el contenido intracelular de la clona I a diferentes valores de pH.	39
7.7. Actividad Específica de la enzima en el contenido intracelular de la clona G a diferentes valores de temperatura.	41
7.8. Actividad Específica de la enzima en el contenido intracelular de la clona I a diferentes valores de temperatura.	42

## INTRODUCCIÓN

Las enzimas utilizadas en algunos sectores industriales se pueden obtener de diversos organismos, ya sean de animales, vegetales o de organismos unicelulares. Hoy en día, los microorganismos se han convertido en la fuente principal de enzimas, aunque las provenientes de animales y vegetales se siguen utilizando en determinadas aplicaciones. Las enzimas presentan una gran importancia en la industria de la transformación de alimentos, ya que éstas se pueden emplear en la producción de algunos ingredientes y/o en la modificación de diversos parámetros como textura, sabor, entre otros.

El grupo de investigación de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch se ha dedicado a estudiar los microorganismos que se encuentran en el queso Cotija, en donde se han identificado algunos de ellos, ya sean provenientes de la materia prima o del proceso de elaboración, que presentan actividad lipolítica. Recientemente, se elaboró una biblioteca metagenómica a partir de toda la microbiota presente en este tipo de queso con el objetivo de buscar enzimas con actividad esterasa. Se encontraron diversas clonas que presentan de manera presuntiva dicha actividad, las cuales aún no se han estudiado a profundidad.

Es por esa razón que en este proyecto se estudiaron algunas de las clonas aisladas de esta biblioteca metagenómica; éstas fueron seleccionadas por su capacidad de hidrolizar sustratos de cadena corta, como la tributirina. De todas las clonas seleccionadas, dos se caracterizaron de manera bioquímica. Con esta caracterización se podrá proponer el uso de estas enzimas en algunos procesos industriales, principalmente en la industria de alimentos.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1. Queso Cotija

El queso Cotija es un producto lácteo artesanal, madurado, salado, de pasta dura, no cocida, de textura desmoronable que se elabora desde hace más de cuatro siglos, en la sierra ubicada entre los estados de Jalisco y Michoacán (Sierra de JalMich) (Figura 1.1). Es elaborado a partir de leche entera bronca (no pasteurizada) del ganado cebuino que se alimenta bajo un sistema de libre pastoreo dentro de la sierra de JalMich. Su periodo de elaboración se restringe a los meses de lluvia debido a que la vegetación con la que se alimenta el ganado es más abundante durante esta época, aumentando su producción de leche (Álvarez, *et al.*, 2005). Este tipo de queso posee una fuerte raíz histórica nacional y tiene un arraigo en la cultura de la región donde se elabora.

### 1.1.1. Zona geográfica y sus recursos específicos.

Es importante especificar que la zona de producción de la leche y la zona de elaboración del queso es la misma. De hecho, el queso se caracteriza por ser producido por los mismos ganaderos, a partir de la leche de su propio ganado, únicamente.

La zona, con una forma de herradura orientada al norte, abarca una superficie de aproximadamente 2,400 km<sup>2</sup>. Es una zona continua, ubicada en la sierra JalMich, entre los estados de Jalisco y de Michoacán, incluyendo principalmente los municipios de Santa María del Oro (Jalisco) y la parte sur de los municipios de Cotija y de Tocuambo (Michoacán). Además, se extiende a territorio de los municipios siguientes: norte de Jilotlan de los Dolores, oriente de Tamazula, sur de Valle de Juárez y de Quitupan (Jalisco); suroeste de los Reyes, Periban y Tancitaro, y norte de Buena Vista Tomatlan (Michoacán).

Se distingue esa región por su cultura ranchera, diferente de las culturas de las poblaciones de las regiones vecinas: la región plana, agrícola y ejidal de Tierra Caliente con la cual limita al sur, así como el territorio indígena de la Sierra Purépecha al oriente mayoritariamente comunal, y con las zonas boscosas, en su mayor parte también comunales, de la Sierra del Tigre al norte, la de Tamazula y la del Alo al poniente.

No existe otra actividad económica fuerte en la zona: hay pocas empresas, no hay turismo (no hay en la sierra de JalMich, pero si en las zonas y pueblos contiguos). La población de la sierra JalMich, aislada, tiene básicamente dos medios de subsistencia: la crianza de ganado vacuno o la emigración hacia los grandes centros urbanos del país y sobre todo hacia Estados Unidos (Pomeón, 2007).





**Figura 1.1** Zona de producción del queso Cotija, según definida por las reglas de uso de la marca colectiva “Queso “Cotija Región de Origen” (Barajas, *et al*, 2005).

### 1.1.2. Proceso de elaboración

De acuerdo a las costumbres de algunos productores observadas por García-Saturnino (2006) durante una visita de campo y a lo que estipula las Reglas de Uso, el proceso de elaboración del queso Cotija, Región de Origen, se describe a continuación (Figura 1.2):

1. **Preparación de la leche.** La leche se filtra pasándola por un lienzo limpio y se vacía en un recipiente de acero inoxidable, dejándola en reposo hasta que su temperatura disminuya a una temperatura de 30-33°C.
2. **Adición del cuajo.** Se adiciona el cuajo distribuyéndolo eficientemente en toda la leche con un utensilio apropiado. La leche se deja reposar.
3. **Corte de cuajada y desuerado.** Una vez formada la cuajada, se corta en trozos de 1 cm<sup>3</sup> aproximadamente con un cuchillo, dejándola reposar hasta que el suero se separe de la cuajada. El suero es eliminado por decantación.
4. **Amasado y salado de la cuajada.** La cuajada se amasa una vez que ya se separó del suero. Para la realización del amasado se puede trabajar en una mesa o en la misma tina del cuajado. En esta etapa se añade la sal, en proporción del 5 al 10% con relación a los litros de leche empleados. El salado de la cuajada debe realizarse dentro de las 9 horas posteriores a la hora de inicio del ordeño.

5. **Moldeado y prensado de la cuajada.** La cuajada salada y amasada se vacía en un molde, compuesto por un aro forrado en su interior con dos mantas de ixtle (fibra de maguey) o algodón, con las que se envuelve la cuajada para darle la forma cilíndrica tradicional del queso. La pasta fajada se prensa por 18 a 24 horas, volteando la pieza a la mitad del periodo de prensado.
6. **Oreado de la cuajada.** La pieza de queso es fajada, para que no pierda su forma cilíndrica y se le debe aplicar una fuerza suficiente con el aro para que permita seguir desuerando durante un periodo de 15 días mínimo, hasta que por efecto del desuerado y la presión del aro, la pieza este firme y pueda ser manipulada libremente.
7. **Maduración del queso.** El queso debe mantenerse por un periodo mínimo de tres meses en un lugar destinado para su efecto, limpio y adecuado, siempre manteniendo las condiciones higiénicas. Las condiciones ambientales necesarias para la maduración del queso durante los primeros tres meses de vida de anaquel son: a) Temperatura: < 28 °C y b) Humedad relativa: 80 a 95°C. Durante esta etapa, el queso debe mantenerse protegido del sol y de la lluvia, así como de cualquier agente contaminante o materia extraña. La corteza debe limpiarse con un lienzo limpio, volteando la pieza para favorecer la difusión de solutos y la adecuada formación de la misma, por lo menos, cada tercer día.

El resultado de todas las etapas del proceso de elaboración es un queso de pasta dura madurado, salado, sabor pronunciado, aroma fuerte, textura desmoronable, con un peso aproximado de 25 kg listo para su consumo y que no requiere refrigeración para su conservación. Por otra parte, el queso Cotija artesanal madurado también cumple con las siguientes especificaciones: proteínas propias de leche, mínimo 25% (m/m); grasa butírica, mínimo 23% (m/m); humedad, máximo 36% (m/m) (Hernández., 2010).

La elaboración del queso con leche cruda de ganado Cebí o Criollo, la ausencia de algún tratamiento térmico durante el proceso, el salado y amasado manual, el prensado fuerte y el tiempo mínimo de tres meses de maduración antes de ser consumido, son algunos aspectos que diferencian al verdadero queso Cotija de los demás quesos tipo Cotija (García, 2006).

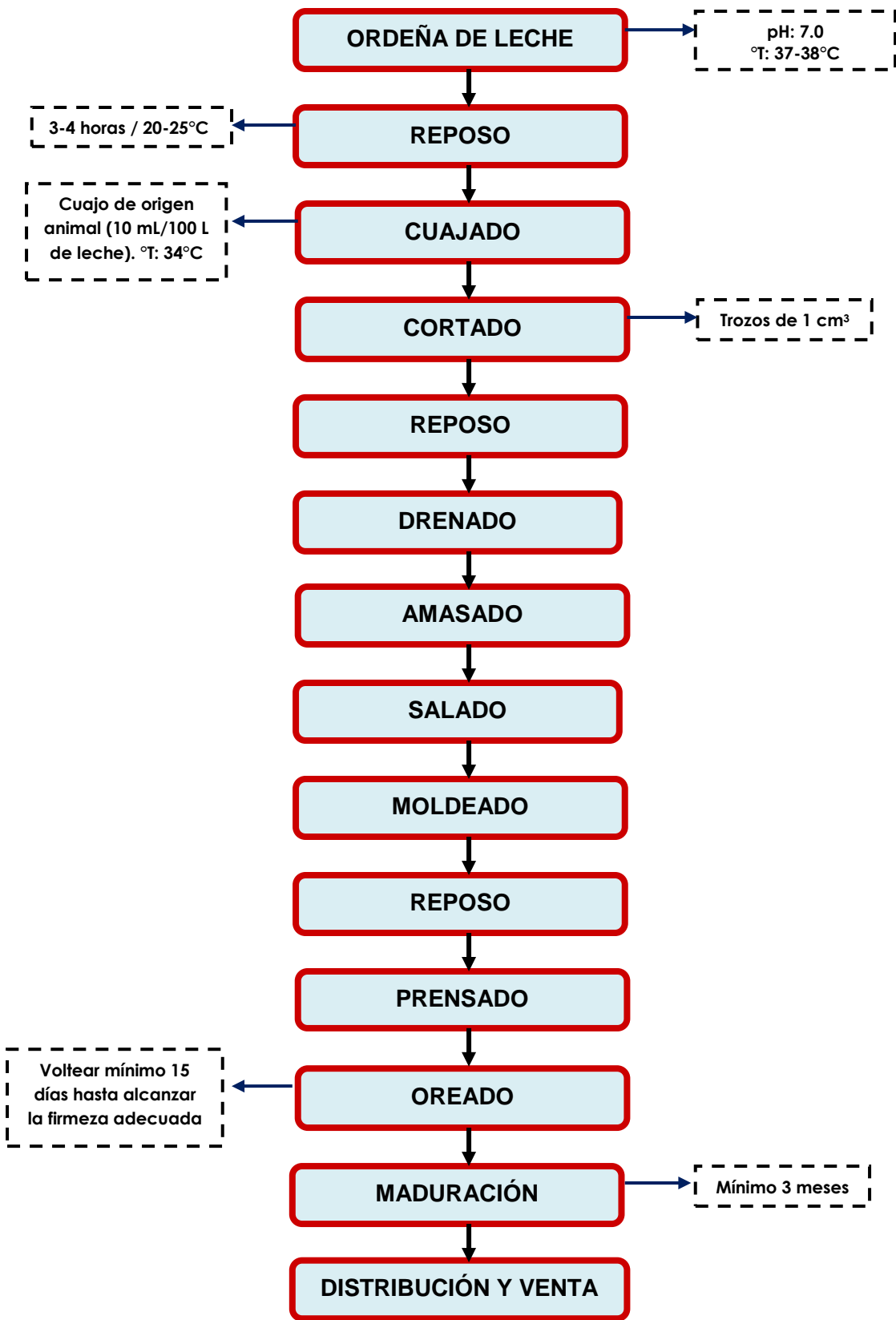


Figura 1.2. Etapas del proceso de elaboración del queso Cotija (Alvarez, *et al.*, 2005).

## 1.2. Enzimas

Una enzima es una proteína que actúa como catalizador biológico, llevando a cabo reacciones bioquímicas a altas velocidades, no se consume durante la reacción y en general presenta un elevado grado de especificidad. Todas las células, incluyendo microorganismos y organismos superiores, producen enzimas. Su acción está estrechamente ligada con las reacciones metabólicas, y la mayoría de las transformaciones químicas requeridas para mantener activas a las células tardarían mucho tiempo en efectuarse o simplemente no procederían si no estuvieran presentes las enzimas. Su estudio en el campo de los alimentos es de primordial interés debido a que son responsables de algunos cambios químicos que éstos sufren, cambios que pueden resultar en beneficios (maduración de frutas) o perjuicios (oxidación de ácidos grasos y oscurecimiento enzimático). Por otro lado, muchos productos alimenticios se obtienen a través de reacciones bioquímicas que se efectúan por medio de enzimas endógenas del alimento, por las que se le añaden o las producidas por los microorganismos utilizados en la elaboración de alimentos fermentados (López y Quirasco, 2006).

Las enzimas se clasifican en 6 grandes grupos enunciadas por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, de acuerdo a la reacción química que catalizan, independientemente de su origen o de la presencia de grupos prostéticos. Los nombres de las enzimas van precedidos de las letras *Enzyme Code* (EC) y el número correspondiente al tipo de enzima de la siguiente clasificación (IUBMB, 2017):

1. **Oxidoreductasas (EC 1)**. Catalizan reacciones de oxidorreducción. En este grupo se incluyen las deshidrogenasas, oxidasas, oxigenasas y peroxidasas.
2. **Transferasas (EC 2)**. Promueven la transferencia de distintos grupos químicos entre una molécula donadora y otra receptora. Dentro de las más estudiadas se incluyen las glicosil transferasas, amino transferasas y fosfo transferasas.
3. **Hidrolasas (EC 3)**. Son un grupo de enzimas que catalizan la ruptura de un enlace por la adición de una molécula de agua. Se dividen en 12 subgrupos dependiendo del tipo de enlace que hidrolizan.
4. **Liasas (EC 4)**. Rompen enlaces para la eliminación de un determinado grupo químico del sustrato y forman dobles ligaduras sin la introducción de moléculas de agua. Entre ellas se encuentran: aldolasas, descarboxilasas, deshidratasas y pectina liasa.
5. **Isomerasas (EC 5)**. Catalizan el rearrreglo espacial de grupos del sustrato sin modificar su composición química; y son: epimerasas y racemasas.
6. **Ligasas (EC 6)**. Promueven la unión covalente de dos moléculas acopladas con la ruptura de un enlace pirofosfato proveniente de ATP, UTP o CTP, como fuente de energía. El término ligasa es sinónimo de sintetasa.

### 1.2.1. Hidrolasas

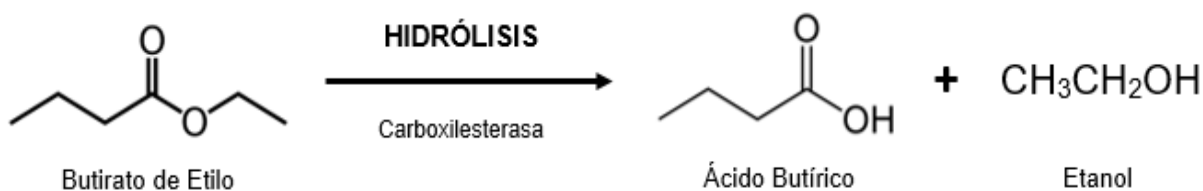
La familia de las hidrolasas está conformada por esterases, fosfolipasas, proteasas, amidasas, epoxihidrolasas, glicosidasas y otras enzimas más. Este grupo de enzimas puede catalizar la hidrólisis de un enlace en presencia de agua, así como reacciones de condensación (reacción inversa a la hidrólisis) y alcoholólisis (ruptura de enlaces utilizando una molécula de alcohol en lugar de agua).

La mayor parte de las biotransformaciones realizadas en síntesis orgánica son llevadas a cabo por las hidrolasas, por presentar características como: amplia especificidad por sustrato, aceptación como sustrato a algunos intermediarios sintéticos y una alta estereoselectividad (incluso hacia diversos sustratos no naturales)

El potencial biotecnológico de las enzimas hidrolíticas es de especial interés, ya que éstas presentan varias ventajas que las hace ideales para utilizarse como catalizadores en química y síntesis orgánica. La mayoría de las enzimas de este grupo que se utilizan en la industria son de origen microbiano, principalmente de bacterias y hongos. (Bornscheuer y Kazlauska, 2006).

### 1.2.2. Carboxilesterasas

Las carboxilesterasas (EC 3.1.1.x) representan un grupo diverso de hidrolasas que catalizan la formación o ruptura de enlaces éster (Figura 1.3), las cuales están distribuidas ampliamente en animales, plantas y microorganismos (Bornscheuer, 2001).



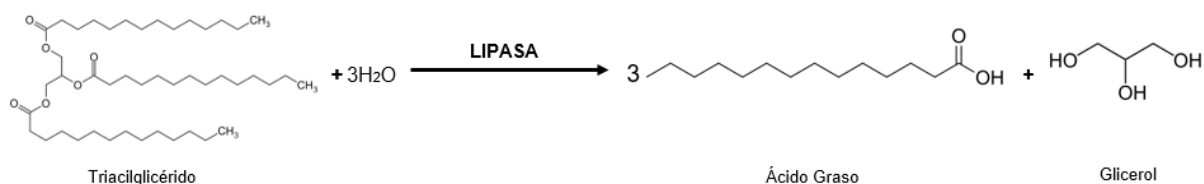
**Figura 1.3.** Ejemplo de una reacción de hidrólisis del enlace éster

Existe una gran diversidad de carboxilesterasas, por lo que hay una nomenclatura muy grande y variada. Éstas se pueden dividir en hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos (pectinesterasas, colinesterasas), desoxiribonucleasas, endonucleasas, exonucleasas, fosfodiesterasas, fosfortriesterasas, ribonucleasas, sulfatasas y tioesterasas.

Existen dos clases de hidrolasas que son de gran importancia: las lipasas (EC 3.1.1.3. o triacilglicerol hidrolasas) y las esterases (EC 3.1.1.1. o carboxil-éster hidrolasas).

### 1.2.3. Lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3) constituyen un grupo de enzimas que degradan los triacilglicerolos, para liberar ácidos grasos y glicerol (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Acción catalítica de las lipasas. Un triglicérido puede ser hidrolizado para formar glicerol y un ácido graso; la reacción inversa favorece la reacción para formar un triglicérido.

Los sustratos naturales de las lipasas son triacilglicerolos con un largo de cadena superior a diez átomos de carbono, los cuales tienen una baja solubilidad en agua, por lo que la reacción es generalmente catalizada en una interface agua-lípido (activación interfacial).

Las lipasas tienen un amplio intervalo de sustratos, sin embargo, son altamente específicas en catálisis quimio-, regio- y enantioselectiva, por lo que ofrecen una alternativa para ser explotadas en síntesis orgánica como en reacciones de esterificación y transesterificación a partir de alcoholes y ésteres. Las lipasas están presentes en todos los organismos vivos, pues tienen un importante papel metabólico. Aunque éstas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se localizan abundantemente en los microorganismos, es decir, en bacterias, hongos y levaduras (Jaeger, *et al*, 1999).

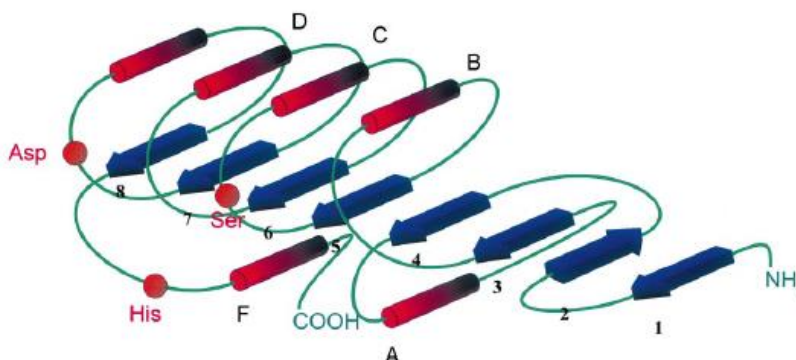
### 1.2.4. Esterasas

Las esterazas (E.C. 3.1.1.1), o también llamadas hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos, son enzimas que, al igual que las lipasas, están ampliamente distribuidas en diversos organismos como animales, plantas y microorganismos (Chao, *et al.*, 2003). Actúan preferentemente sobre el enlace éster de ácidos grasos y triacilglicerolos de cadena corta, por lo que su máxima actividad es sobre sustratos solubles.

Sin embargo, también pueden catalizar la síntesis de ésteres, así como reacciones de transesterificación (Peña, 2009). En general, las esterazas muestran alta regio- y estereoespecificidad, siendo de gran utilidad en la síntesis de compuestos ópticamente puros. Además, no requieren de cofactor y son estables, e incluso activas, en diversos disolventes orgánicos (Bornscheuer, 2001). Se ha reportado que las carboxilesterasas pueden participar en algunas funciones fisiológicas, como en el suministro de carbono como fuente de energía, en la patogenicidad de plantas y en la desintoxicación de varios pesticidas (Ferreira *et al.*, 1993; Prim *et al.*, 2000; McQueen, *et al.*, 1987; Blackman, *et al*, 1995)

### 1.2.5. Estructura y mecanismo catalítico de las carboxilesterasas.

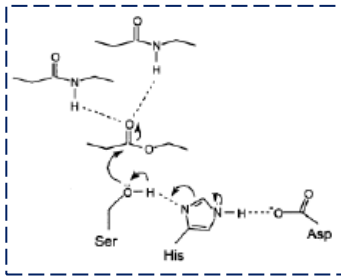
Las esterasas y lipasas pertenecen al grupo de las  $\alpha/\beta$ -hidrolasas; comparten una estructura de plegamiento y una maquinaria catalítica similar. El diseño del plegamiento consta en una estructura central hidrofóbica de láminas  $\beta$  con ocho hojas paralelas, con excepción de la segunda (que es antiparalela), donde las láminas  $\beta$  de la tres a la ocho están unidas con seis  $\alpha$  hélices (A-F) que rodean la estructura central (Uppenberg, 1994) (Figura 1.6).



**Figura 1.5.** Representación esquemática del plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa. Las hojas  $\beta$  son representadas con las flechas de color azul y las  $\alpha$ -hélices se muestran como cilindros color rojo. La posición de los residuos de la triada catalítica son señalados con círculos color anaranjado (Bornscheuer, 2001).

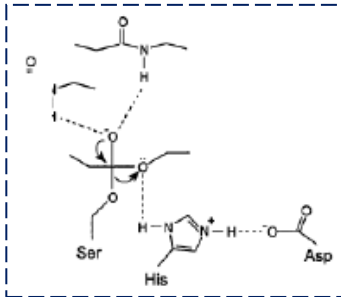
Su sitio activo está integrado por tres aminoácidos denominados “triada catalítica”, constituido por una serina, una histidina y un ácido aspártico/glutámico (Ser-His-Asp/Glu). Adicionalmente, para estabilizar el sustrato se ha identificado una cavidad que forma un oxianión y tres compartimientos para acomodar los ácidos grasos del triacilglicerol. Como característica particular, las lipasas presentan una máxima actividad catalítica solamente cuando actúan en una interfase agua-aceite, fenómeno que se denomina como “activación interfacial”. Esta propiedad se debe a la presencia de una estructura terciaria única que forma una especie de “tapa” peptídica anfifílica compuesta por una  $\alpha$  hélice que cubre la entrada al sitio catalítico. Dicha tapa, al estar en contacto con la fase oleosa, se activa y sufre un cambio conformacional dejando expuesta la entrada del sitio activo para la libre llegada del sustrato; sin embargo, existen excepciones en donde algunas lipasas no presentan dicho fenómeno a pesar de contar con la “tapa”, exponiendo su sitio activo en todo momento, lo cual aumenta su versatilidad. El mecanismo catalítico al que se ajustan la mayoría de las esterasas es químicamente parecido a una reacción de sustitución nucleofílica  $S_N2$ , donde de manera general, el modelo consiste en la entrada de un primer sustrato y la salida consecuente de un primer producto, seguido de la entrada de un segundo sustrato para originar y expulsar el segundo producto (García, *et al.*, 2000).

[1]



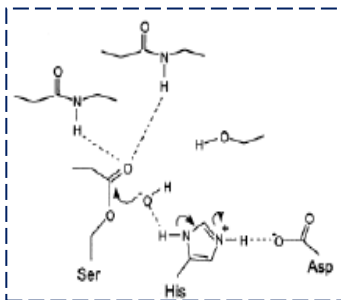
El mecanismo de hidrólisis consiste en el incremento del carácter nucleofílico de la serina por la transferencia de un protón del residuo de Histidina, conduciendo al ataque por parte del átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la serina sobre el carbono del grupo carbonilo del enlace éster susceptible.

[2]



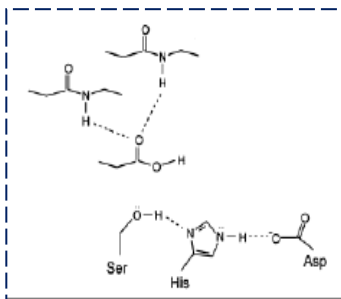
Se forma un intermediario tetraédrico, donde el átomo de oxígeno del carbonilo se carga negativamente y se estabiliza a través de puentes de hidrógeno con los grupos NH de la cadena principal.

[3]



Estos residuos constituyen la cavidad oxaniónica, que, en algunas esterasas, es preformada con la orientación correcta. Posteriormente, la histidina dona un protón al oxígeno del éster en el enlace donde se va a llevar a cabo su ruptura; se libera el alcohol correspondiente y se forma un segundo intermediario con el ácido carboxílico del sustrato que se encuentra esterificando a la serina.

[4]



En este paso ocurre un ataque nucleofílico al átomo de carbono del carbonilo intermediario covalente por parte de una molécula de agua, que provoca la ruptura del enlace éster entre la serina y el componente acilo; resultando en la liberación del ácido carboxílico y la regeneración de la esterasa.

**Figura 1.6.** Mecanismo de hidrólisis de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas en el sitio activo. [1] Ataque nucleofílico; [2] Intermediario tetraédrico; [3] Desacetilación; [4] Liberación del producto y regeneración de la enzima (Jaeger *et al.*, 1998).



### 1.2.6. Aplicación e importancia de las hidrolasas en la industria alimentaria.

Hoy en día, la tecnología enzimática ocupa un lugar preponderante dentro de la biotecnología y específicamente dentro del sector alimentario. Alrededor del 65% de las enzimas que se producen industrialmente están de una u otra manera relacionadas con la industria alimentaria (Del Moral, 2015). Las enzimas comerciales utilizadas por la industria pueden surgir de fuentes animales, vegetales o microbianas. Los microorganismos se han convertido en la fuente principal de enzimas comerciales, aunque las enzimas animales y vegetales aún se utilizan en algunas aplicaciones. Las enzimas son muy importantes en la industria de la transformación de alimentos, en la producción de ingredientes y en la modificación diversos aspectos como el sabor, la textura y composición de alimentos. Las ventajas de emplear enzimas microbianas en procesos industriales son debidas a 1) la existencia de múltiples tipos de actividades enzimáticas, 2) la rapidez y estabilidad de producción mediante un proceso barato de fermentación microbiana, reproducible y seguro, 3) las mejoras en cuanto a rendimiento, especificidad, estabilidad, etc., se pueden obtener mucho más fácil mediante ingeniería genética que por medio de la mejora del cultivo de vegetales o cría de animales (Smith, 2004). Las enzimas intervienen en prácticamente todas las áreas involucradas en la tecnología de alimentos (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1.** Utilización de enzimas en el procesamiento de alimentos (Smith, 2004)

<b>Industria</b>	<b>Enzima utilizada</b>	<b>Inversión (millones de dólares)</b>
<b>Cervecera</b>	$\alpha$ -amilasa, $\beta$ -amilasa, proteasas, amiloglucosidasa, xilanasas	\$30.0
<b>Lechera</b>	Quimosinas, animales/microbianas, lactasa, lipasa, lisozima	\$90.0
<b>Panadera</b>	$\alpha$ -amilasa, xilanasas, proteasa, fosfolipasa A y D, lipoxigenasa	\$20.0
<b>Procesamiento de frutas y vegetales</b>	Pectinesterasa, poligalacturanasa, pectinoliasa, hemicelulasas	\$18.0
<b>Almidón y azúcar</b>	$\alpha$ -amilasa, $\beta$ -amilasa, glucoamilasa, xilanasas, pululanasa, isomerasa, oligoamilasas	\$120.0

Dentro del grupo de las carboxilesterasas, las que poseen mayor aplicación industrial son las lipasas. Estas enzimas se consideran entre los biocatalizadores más versátiles que existen. Pueden llevar a cabo un amplio espectro de reacciones de bioconversión, como hidrólisis, interesterificación, esterificación, alcoholólisis, acidólisis y aminólisis. De ahí, el incremento exponencial de sus aplicaciones en biotecnología en comparación con otras enzimas hidrolíticas. En la industria alimentaria, las carboxilesterasas comúnmente se utilizan para mejorar el sabor de ciertos tipos de quesos (Romano, Provolone, Feta, etc.), así como en queso

procesado o para acelerar su maduración. La mantequilla modificada con lipasas libera ácidos grasos de cadena larga. Estas moléculas con propiedades saborizantes se utilizan en pastelería y sustitutos de crema para conferir un sabor cremoso al café. En la Tabla 1.2 se muestra algunas esterasas comerciales utilizadas en alimentos, así como su fuente y sus condiciones óptimas de reacción.

**Tabla 1.2.** Algunas propiedades y aplicaciones de las esterasas comerciales (Lee, 1996).

Origen (especificidad)	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Aplicaciones
<b>Páncreas</b>	8.0	50.0	Enzimas digestivas
<i>Aspergillus niger</i>	7.0	45.0	Interesterificación de grasas
<i>Rhizomucor miehei</i>	7.5	50.0	Elaboración de queso y saborizantes a mantequilla
<i>Rhizopus delemar</i>	5.6	35.0	Aceleración de la maduración del queso; queso modificado por enzimas
<i>Candida cylindracea</i>	7.5	50.0	Elaboración de jabones.

Las esterasas tienen una gran importancia en estos procesos ya que se encargan de modular el perfil de ésteres presentes en un alimento, los cuales juegan un papel determinante en la calidad del producto final (Smith, 2004; Lee, 1996).

Su intervalo de aplicación está en pleno crecimiento gracias a las tecnologías de ingeniería genética, evolución dirigida y diseño racional de proteínas. Estas aproximaciones permiten, por un lado, optimizar la actuación de estas enzimas en sus aplicaciones industriales tradicionales, y, por otro lado, extender su uso a otros campos en los que actualmente, debido a impedimentos intrínsecos de su propia naturaleza, todavía no han podido ser aplicadas.

### **1.2.7. Actividades enzimáticas importantes durante la maduración de quesos.**

La maduración de los quesos conduce a cambios en sus propiedades físicas, de apariencia, de sabor y de aroma debido a la combinación de factores que, junto con los microorganismos, se reconoce que son agentes de importancia. En el aspecto bioquímico, la maduración de un queso implica tres grandes fenómenos complejos: la fermentación de carbohidratos, la hidrólisis de la grasa presente en la leche y la degradación de las proteínas. Durante esta etapa, la composición de ácidos grasos, péptidos, vitaminas, entre otros, varían debido a las diversas transformaciones químicas y bioquímicas que ocurren. Las lipasas y proteasas son las enzimas nativas de la leche más importantes durante el proceso de maduración (Marilley, *et al*, 2004; Schlimme, 2002).

La proteólisis es uno de los procesos más importantes de la maduración, pues no solamente tiene implicaciones en el sabor del queso, sino también en su aspecto y textura. La proteólisis consiste en la degradación parcial de las proteínas en productos más simples y más solubles, como péptidos y aminoácidos asimilables que, por medio de reacciones químicas, dan lugar a los compuestos que contribuyen a las características sensoriales de los quesos madurados (Fox, *et al*, 2000).

Por otra parte, la grasa de la leche constituye la fuente a partir de la cual se forman algunos componentes que son responsables del aroma y la textura del queso madurado. La lipólisis es la causa de la generación de los principales compuestos responsables de las características sensoriales del producto: los ácidos grasos libres y algunos derivados de su transformación. La influencia de la grasa en estas características no solo depende de la variedad del queso elaborado, sino también de la composición y propiedades físicas de este componente; así, su hidrólisis libera ácidos grasos volátiles como ácido butírico, caproico, caprílico y cáprico. Los productos de degradación de la materia grasa (ácidos grasos libres, metilcetonas y ésteres) desempeñan una función primordial en el aroma (Haug, *et al*, 2007).

La maduración de un queso es un fenómeno muy complejo debido a la naturaleza de los componentes que conforman la leche (carbohidratos, lípidos, proteínas, principalmente), la variedad de microorganismos presentes y el gran número de enzimas que en ella participan. A medida que la maduración progresa, el aroma y el sabor del queso cambian, dependiendo de la temperatura de maduración y de la duración de su almacenamiento.

#### **1.2.8. Factores que afectan la velocidad de las reacciones enzimáticas.**

La velocidad a la que las reacciones enzimáticas proceden depende de varios factores, dentro de los que destacan el pH del medio de reacción, la temperatura, la concentración de sustrato y enzima, entre los más importantes (Whitaker, 2000).

- a) **Efecto del pH.** Los valores de pH extremos suelen inactivar a las enzimas. Por lo general, éstas presentan una máxima actividad a un valor determinado de pH, al que se denomina como pH óptimo. La mayor parte de las enzimas presentan su actividad máxima a pH entre 4.5-8.0. Existen, sin embargo, enzimas con un pH óptimo extremo, como la pepsina, que lo tiene a pH 1.8, o la arginasa, cuyo valor óptimo se encuentra a pH 10.0. A valores de pH extremos, la actividad enzimática suele decaer irreversiblemente debido a procesos de desnaturalización proteica. La actividad de las enzimas depende fuertemente de la concentración de iones hidronio del medio, ya que esto afecta el grado de ionización de los aminoácidos de la proteína, incluyendo a los del sitio activo, del sustrato (en caso de ser ionizable), o del complejo enzima-sustrato. El pH influye en la estructura tridimensional de la proteína y a su vez, sobre la afinidad que

tenga la enzima por el sustrato. Para su aplicación en alimentos, hay que considerar que el pH en su mayoría varía entre 3.0 y 7.0; hay algunas excepciones en donde algunas frutas y sus derivados tienen un pH más ácido que llega a ser de 2.2.

- b) **Efecto de la temperatura.** Los efectos de la temperatura sobre las enzimas son muy complejos; por ejemplo, las temperaturas elevadas pueden afectar el estado de disociación de los grupos funcionales involucrados en la reacción enzimática, a la afinidad de la enzima por activadores o inhibidores y a otras cuestiones secundarias, como a la solubilidad de oxígeno, que puede ser uno de los sustratos de la reacción. En general, las enzimas operan muy lentamente a temperaturas de congelación y su actividad aumenta cuando lo hace la temperatura. La mayor parte de las enzimas presenta su actividad óptima en el intervalo 30-40°C y, por arriba de 45°C, comienza a desnaturalizarse. La velocidad de las reacciones enzimáticas se incrementa con la temperatura, al aumentar la energía cinética de las moléculas, pero sólo en el intervalo en que la enzima es estable y retiene su capacidad catalítica; en casos extremos, cuando el incremento es muy grande, se favorece la desnaturalización y consecuentemente la proteína pierde su capacidad catalítica.
- c) **Efecto de la concentración de sustrato.** Una enzima funciona de manera más eficiente cuando la concentración de sustrato está en exceso en relación con la concentración de enzima, hasta llegar a un límite; en el que todas las enzimas están funcionando a la máxima velocidad. Cuando los sitios activos disponibles se saturan, se alcanza la velocidad máxima y la velocidad de reacción ya no aumentará, aunque la concentración de sustrato incremente.

### **1.3. Biblioteca Metagenómica**

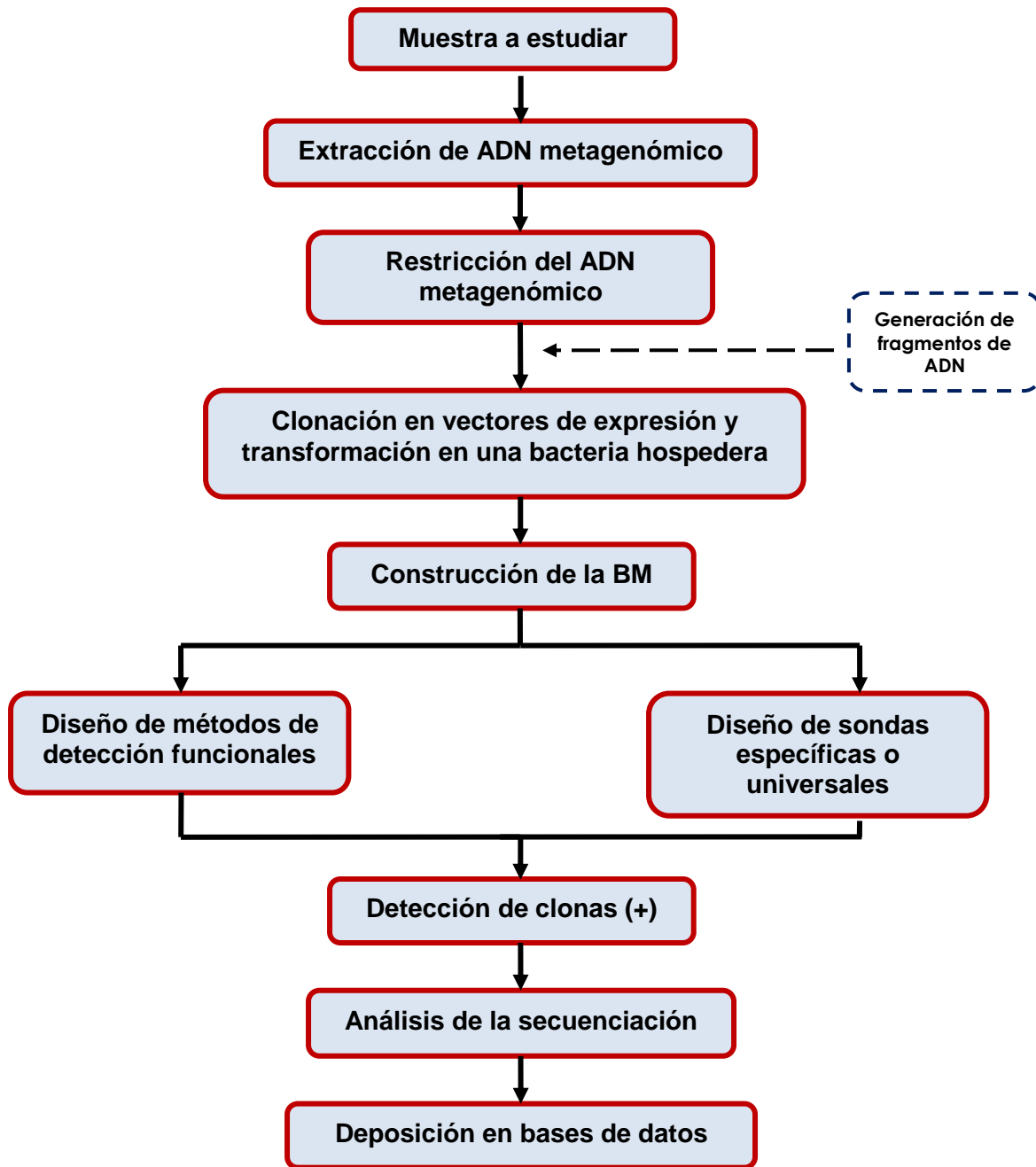
La metagenómica es una disciplina que surge de las ciencias genómicas, la cual se refiere al estudio del metagenoma de un nicho en particular. El metagenoma se puede definir como el total de ADN de una muestra determinada. Al estudiar el metagenoma de un ambiente, es muy probable que éste consista en gran parte de bacterias u otros organismos no cultivables; solo conocemos una pequeña proporción de éstos, los cuales se pueden reproducir en condiciones de laboratorio (Handelsman, *et al.*, 1998).

En una biblioteca metagenómica (BM) están representados todos los genes de los microorganismos de un ambiente. La biblioteca es un medio para tener representados a todos los genes de los microorganismos en estudio, pudiéndose estudiar con detalle junto con sus secuencias reguladoras adyacentes. Teóricamente, una BM contiene al menos una copia de las secuencias representadas en el genoma. Sin embargo, cada molécula del vector puede contener sólo unas pocas kpb de ADN insertado, por lo que una consideración que se debe tener en cuenta es la selección del vector más adecuado para contener el genoma completo en el menor número posible de clonas. El número de clones necesarios para contener todas las secuencias en un genoma depende del tamaño medio de los insertos clonados y del tamaño del genoma a clonar.

Una BM se produce de un ADN total extraído de células que contiene todas las secuencias de ADN de todas las especies. Una vez que disponen de una biblioteca metagenómica, los investigadores pueden utilizar esta colección para aislar secuencias específicas de ADN (Karp, 2009). El ADN se trata con enzimas de restricción, que lo fragmentan al azar. Una vez que los vectores recombinantes se producen, pueden almacenarse para usarlos más adelante y, como tal, constituyen una colección permanente de todas las secuencias de ADN presentes en el genoma de las especies del hábitat a estudiar. El uso de ADN fragmentado al azar tiene una ventaja en la construcción de una genoteca, porque genera fragmentos superpuestos que pueden ser útiles en el análisis de regiones de una secuencia particular. Las BM suelen construirse utilizando vectores fágicos, que pueden contener grandes fragmentos cromosómicos (Klug, *et al.*, 1999).

### 1.3.1. Construcción de una biblioteca metagenómica

En el siguiente diagrama se presenta una metodología con los pasos esenciales para la construcción de una biblioteca metagenómica a partir de la muestra en estudio (Figura 1.8).



**Figura 1.7.** Protocolo de construcción de una BM de una muestra en general. (Tomada y modificada de Riesenfeld, *et al*, 2004; Ferrer, *et al.*, 2009).

## 2. ANTECEDENTES

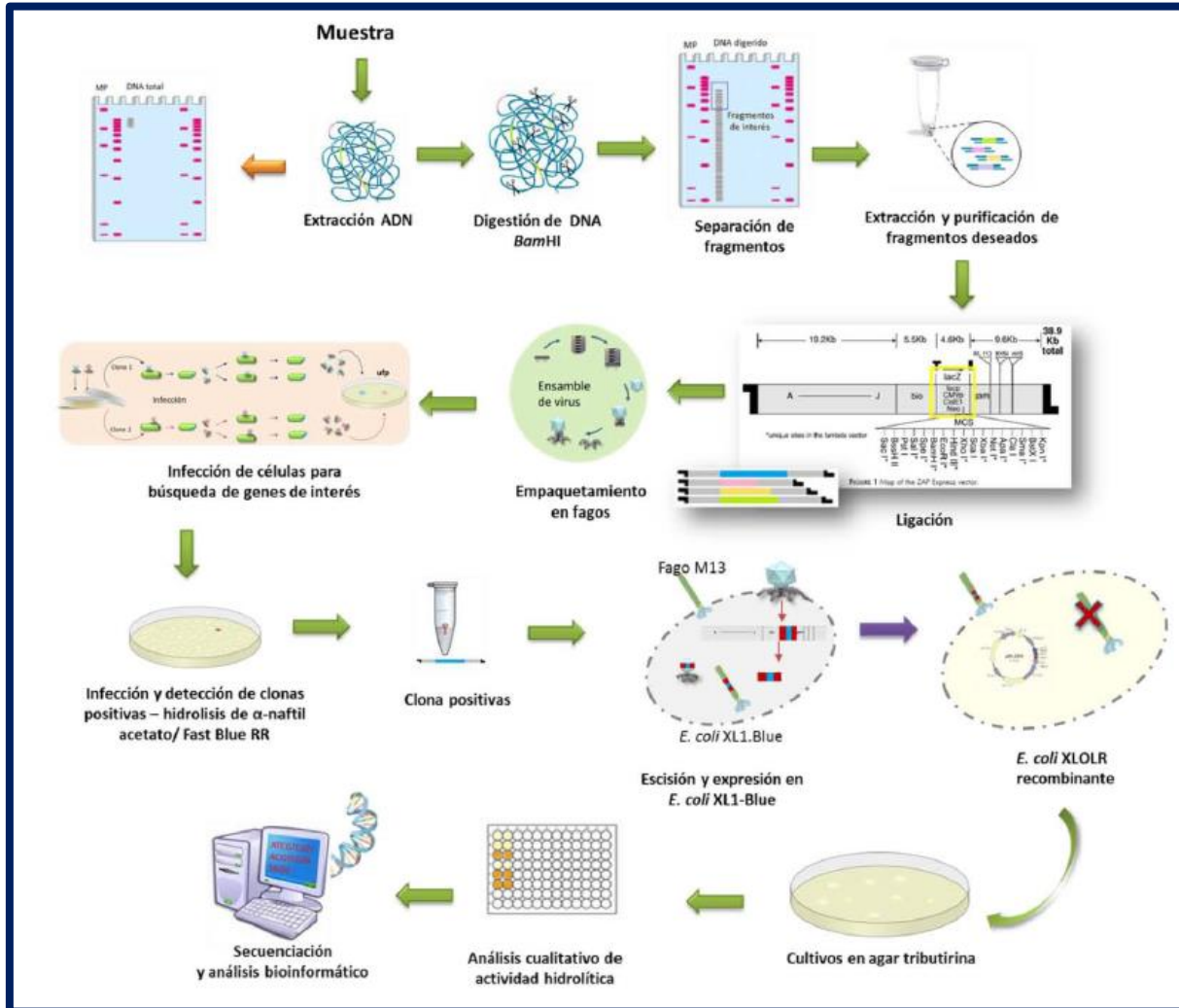
El grupo de investigación de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch, se ha dedicado al análisis de la microbiota presente en el queso Cotija, incluyendo el estudio e identificación de microorganismos con características lipolíticas. Los resultados obtenidos en investigaciones anteriores dan las bases para la realización de este proyecto.

García-Saturnino (2006) aisló diversos microorganismos provenientes del queso Cotija que presentaron actividad lipolítica. Posteriormente, García-Saturnino (2011), en la continuación de la búsqueda de microorganismos lipolíticos, logró aislar ciertos microorganismos en diversos medios selectivos provenientes de diversas etapas de elaboración y después los identificó mediante la técnica de Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGEE). Los resultados que obtuvo mostraron la presencia de *Marinilactobacillus psychrotolerans*, *Psychrobacter* spp. y bacterias del género *Bacillus* en la sal de grano, *Staphylococcus* spp. en todas las etapas de manufactura y *Bacillus pumilus* en la cuajada fresca

Continuando con esta línea de investigación, Alcántara-Sol (2009) realizó la caracterización bioquímica de una lipasa recombinante (LipAQC-6H) proveniente del microorganismo *Bacillus pumilus* QC, denominado así por el medio del que fue aislado, el queso Cotija. Alcántara se encargó de clonar, sobre-expresar, amplificar y secuenciar una lipasa, para después someterla a un proceso de purificación. Posterior a dicho procedimiento, caracterizó bioquímicamente a la actividad lipolítica de la lipasa recombinante y los resultados que obtuvo los comparó con las características que presenta la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1 (LipGMA1-6H), bajo las mismas condiciones de reacción. Ambas enzimas presentan una mayor especificidad por el sustrato *p*-NF-butirato, además de compartir similitudes en sus parámetros cinéticos, siendo sensibles a los cambios de pH y fuerza iónica. Con respecto a su secuenciación, la lipasa recombinante LipAQC-6H comparte un porcentaje de identidad del 96% con respecto a la enzima de *Bacillus pumilus* GMA1.

Por su parte, Torres-Rodríguez (2013) se encargó de buscar enzimas tipo esterasa a partir de la elaboración de una biblioteca metagenómica obtenida de diversas muestras del queso Cotija *Región de Origen*. La construcción de dicha biblioteca se llevó a cabo mediante dos pasos fundamentales: la ligación de los insertos de ADN con el vector y el empaquetamiento de la construcción en las partículas víricas del fago  $\lambda$ . La titulación de la BM se realizó con la bacteria *Escherichia coli* CL1-Blue MRF, el cual, tiene insertado un plásmido que le confiere resistencia a antibióticos como la kanamicina y la tetraciclina (Figura 2.1). El tamaño promedio de fragmentos clonados fue aproximadamente de 7.5 kpb. Considerando que el tamaño de los genes reportados codificante para enzimas esterasas carboxílicas tiene un tamaño ente 700-2500 pb, es probable que los insertos clonados contengan un gen completo. La búsqueda de enzimas

con actividad esterasa en el banco metagenómico se efectuó con el método de identificación funcional basado en la hidrólisis de ésteres de  $\alpha$ -naftilo. De todas las clonas que conforman la BM, sólo trece presentan actividad esterasa positiva, las cuales son el punto de partida para la realización de esta investigación.



**Figura 2.1.** Esquema general de la elaboración de la biblioteca metagenómica del queso Cotija artesanal madurado (Torres, 2016).



### 3. JUSTIFICACIÓN

Las enzimas microbianas, tanto de hongos como de bacterias, tienen un papel muy importante en procesos industriales y biotecnológicos. Los estudios realizados hasta el momento en el grupo de trabajo, mediante técnicas microbiológicas y moleculares, han permitido aislar e identificar, respectivamente, numerosos microorganismos con una actividad enzimática importante a lo largo del proceso de elaboración y maduración del queso Cotija. Sin embargo, estos avances se han limitado al estudio de microorganismos que se han podido cultivar en condiciones de laboratorio. Por lo cual, se decidió analizar a la microbiota de dicho producto a través de la elaboración de una biblioteca metagenómica a partir del ADN de todos los microorganismos del queso, sin importar que se hayan logrado aislar. Se utilizó a *Escherichia coli* XLOXR como bacteria hospedera. De las clonas obtenidas se seleccionaron las que fenotípicamente presentan actividad esterasa al ser cultivadas en un medio de cultivo en presencia de tributirina. Se generaron varias clonas, las cuales no se han analizado ni se han estudiado a profundidad; es por esta razón que en el presente proyecto se propone evaluar bioquímicamente a dos clonas que mostraron la capacidad de hidrolizar tributirina. Considerando la fuente de estas enzimas se prevé un potencial de aplicación de alguna(s) de ellas en el área de alimentos o en otras áreas como la de la industria de detergentes y/o biocombustibles.

## **4. HIPÓTESIS**

Si diversas clonas aisladas de una biblioteca metagenómica elaborada a partir del queso Cotija artesanal madurado presentaron actividad esterasa positiva en pruebas anteriormente realizadas con algunos sustratos ( $\alpha$ -naftilo y agar-tributirina), entonces la enzima recombinante de cada clona seleccionada será una esterasa.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general.**

- Caracterizar parcialmente de manera bioquímica las esterases recombinantes provenientes de un banco metagenómico realizado a partir de un producto tradicional de origen mexicano (queso Cotija).

### **5.2. Objetivos particulares.**

- Evaluar la actividad enzimática esterasa de dos clonas que forman una parte de la biblioteca metagenómica del queso Cotija.
- Identificar las proteínas con actividad enzimática mediante la realización de zimogramas y su comparación con geles SDS-PAGE.
- Evaluar su especificidad por sustrato.
- Determinar el pH y temperatura óptima de la preparación enzimática.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Desarrollo experimental.

Diagrama de flujo del desarrollo experimental (Figura 6.1).

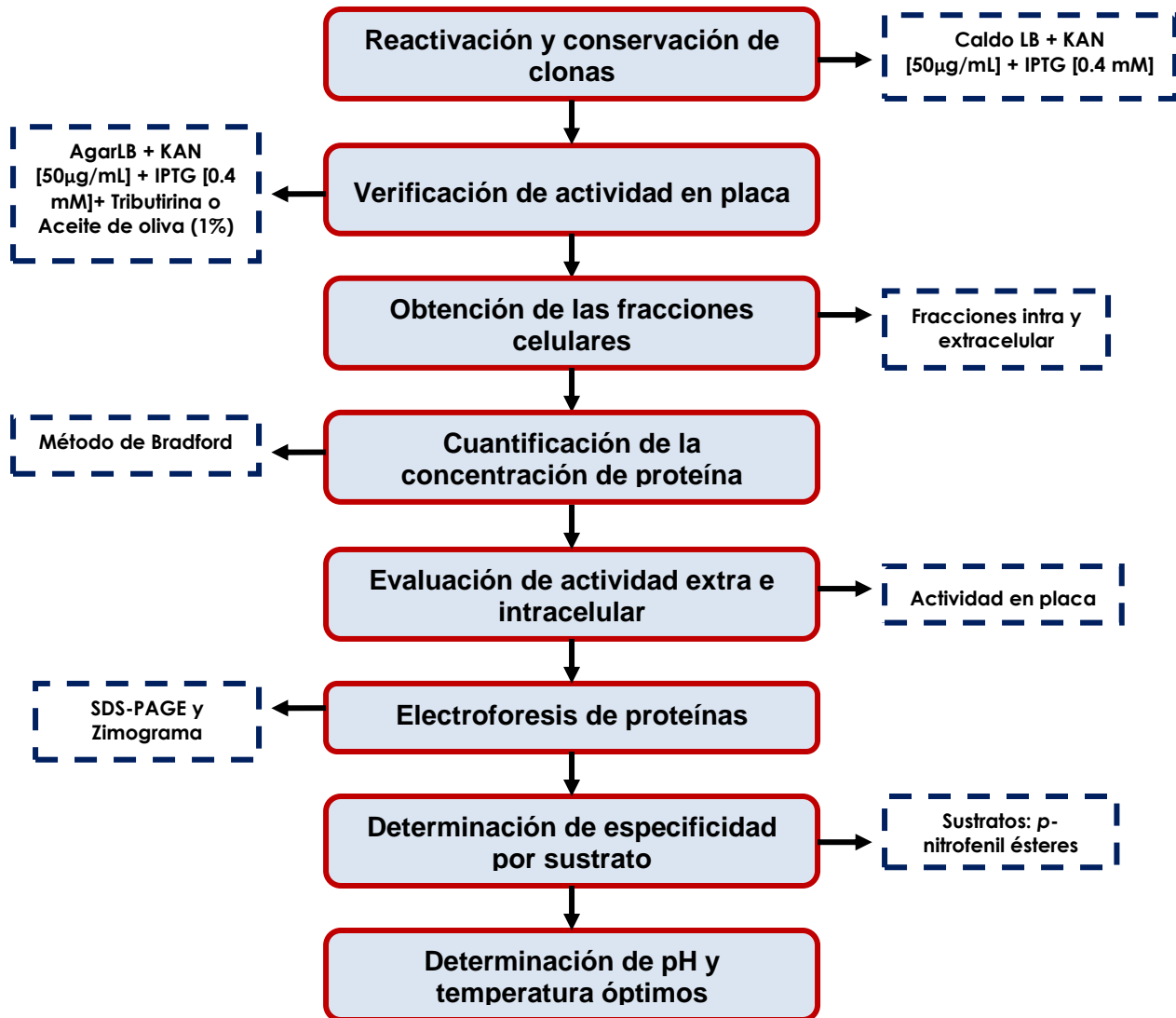


Figura 6.1. Diagrama de la metodología general desarrollado en este proyecto.

### 6.2. Clonas seleccionadas a partir de la biblioteca metagenómica.

De todas las clonas que conforman la biblioteca metagenómica con actividad esterasa presuntiva, se seleccionaron siete, las cuales se les asignó una clave a cada una de ellas (una letra del alfabeto). Las clonas escogidas fueron las siguientes:

Clona	9.3	9.6	10.6	10.7	19.2	19.4	19.5
Clave	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>	<b>J</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>M</b>

### **6.3. Reactivación de las clonas.**

Las clonas utilizadas en este proyecto se conservan en un tubo con glicerol (20%) a  $-70^{\circ}\text{C}$ , por lo que fue necesaria su reactivación. La metodología de reactivación de las clonas, previo a su utilización en otros medios, consistió en su inoculación en el medio de cultivo Caldo LB + kanamicina [50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] + IPTG [0.4 mM] en el cual una vez esterilizado en autoclave cada clona fue inoculada en una campana laminar de uso microbiológico. Posteriormente, los medios de cultivo se incubaron en una estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  para favorecer su crecimiento.

### **6.4. Verificación de actividad enzimática en cajas Petri.**

Se evaluó si las clonas presentaban actividad enzimática en cajas Petri con el medio de cultivo Agar LB + KAN [50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] + IPTG [0.4 mM] + el sustrato homogeneizado al 1 % (Tributirina o Aceite de olivo) para inducir la producción de las esterasas y/o lipasas, respectivamente. Las clonas se inocularon por picadura. Las cajas Petri fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ /estático, con el objetivo de observar la actividad enzimática de las clonas. La actividad positiva (degradación del sustrato) se distinguió como halos claros traslúcidos alrededor de cada colonia, dado que el medio de cultivo es opaco. Se midió el tamaño del halo y el tamaño de la colonia aislada, para reportar el resultado como: diámetro del halo/diámetro de la colonia, con la finalidad de tener un parámetro para identificar cuales clonas presentaron mayor actividad esterasa.

### **6.5. Obtención de las fracciones celulares para cada clona.**

Para realizar los posteriores experimentos, fue necesario obtener las fracciones celulares (intra y extra) de cada clona seleccionada. Se hizo otro medio de cultivo líquido para cada muestra, el cual se incubó a  $37^{\circ}\text{C}/250$  rpm por 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se procedió a realizar la lectura de la densidad óptica para cada medio. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada (0.9-1.0 a 600 nm), cada medio de cultivo se sometió a centrifugación bajo las condiciones de  $10,000 \times g/4^{\circ}\text{C}/15$  min (Centrifuge Biofuge Primo R Heraeus), con el fin de separar las células del medio líquido. De este proceso se obtuvo la preparación extracelular, en donde cada uno se almacenó en tubos Falcon® estériles a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El paquete de células obtenido de este tratamiento fue "lavado" con 1.5 mL de buffer de fosfatos [50 mM] a pH 7.5. Después, cada muestra se centrifugó bajo las mismas condiciones ( $10,000 \text{ g}/4^{\circ}\text{C}/15$  min), se eliminó el sobrenadante y se re-suspendió en 10.0 mL de solución de lisis ([1mM EDTA], [0.3M NaCl], 10% (v/v) glicerol en buffer de fosfato de potasio [50mM] a pH 7.5). En seguida, cada muestra se sonicó en un ultrasonicador (Fisher Scientific F 550 Sonic Dismembrator) por 7 minutos (pulsos de 20 s y 20 s de descanso, alternándose), para obtener la fracción intracelular. Posteriormente, cada muestra se centrifugó a  $30,000 \text{ g}/4^{\circ}\text{C}/10$  min (Beckman Coulter Avanti J-

25) para separar los restos celulares del contenido intracelular. Al final, cada sobrenadante obtenido se almacenó en alícuotas de 2.0 mL en tubos Eppendorf® estériles a -20°C.

#### **6.6. Cuantificación de la concentración de proteína en las fracciones celulares.**

Se determinó la concentración de proteína de cada clona en ambos contenidos celulares mediante la técnica de Bradford (Bradford Protein Assay Bio-Rad). Con los resultados obtenidos, se precisó cuál contenido presentó una mayor concentración de proteína. Las cuantificaciones se realizaron en una microplaca de 96 pozos y el medio de reacción total fue de 200 µL (160 µL de muestra + 40 µL del reactivo de Bradford). Las mediciones se efectuaron en un espectrofotómetro (EPOCH Biotek), empleando una longitud de onda de 595 nm.

#### **6.7. Evaluación cualitativa de la actividad enzimática en las fracciones celulares.**

La determinación cualitativa de la actividad esterasa en cada fracción celular de las clonas seleccionadas se analizó mediante la hidrólisis de acetato de  $\alpha$ -naftilo. Las enzimas esterasas son capaces de hidrolizarlo en naftol y ácido acético; el naftol, forma un complejo colorido con el reactivo *FastBlue* o *FastRed*, generando una coloración marrón o rojiza, respectivamente. Para realizar este experimento, se escogió aquella clona que presentó una menor concentración de proteína en cada fracción celular y ésta concentración se estandarizó en todas las clonas seleccionadas. Los ensayos se realizaron en una microplaca de 96 pozos, en donde el medio de reacción total en cada pozo fue de 225 µL (75 µL de muestra + 75 µL de sustrato (acetato de naftilo [3 mM]) + 75 µL reactivo revelador [1 mM]). El tiempo de reacción fue de 20 minutos a temperatura ambiente (Peña, 2009). La composición de cada reactivo empleado en este experimento se encuentra en la sección de Anexos 11.1.

#### **6.8. Determinación del peso molecular y evaluación de la actividad enzimática en zimograma.**

Debido a que se trabajó con los extractos proteicos de los cultivos celulares, fue indispensable realizar electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y zimogramas para distinguir a las proteínas con actividad esterasa y así determinar su peso molecular. Se utilizaron concentraciones de Acrilamida/Bis-Acrilamida de 4% para el gel concentrador y 12% para el gel separador (Laemmli, 1970).

La preparación de la muestra se efectuó de la siguiente manera: Se calculó la cantidad de la fracción intracelular necesaria para que ésta contuviera 50 µg (tinción con *Coomassie*) y 150 µg (zimograma) de proteína. Después se diluyó con un buffer de carga con una concentración 4X. La cantidad añadida de buffer de carga con  $\beta$ -mercaptoetanol fue tal que al final su concentración debió ser de 1X. Se re-suspendió la mezcla vigorosamente en un vortex y se

calentó durante 5 minutos a 100°C para desnaturalizar las proteínas. Después del periodo de calentamiento, éstas se almacenaron a -20°C hasta el momento de cargar el gel. Se utilizó un marcador de bajo peso molecular (BioRad), el cual se cargó en el primer carril del gel. Una vez cargadas las muestras dentro del gel, éste se corrió a 80 V por 30 minutos a temperatura ambiente. Al observar que el frente de corrida estaba a la mitad del gel, se cambiaron las condiciones a 120 V a 4°C; esto se hizo con el objetivo de no sobrecalentar la cámara de electroforesis. Al terminar el proceso de electroforesis, los geles se lavaron con buffer de fosfatos [50 mM] durante 10 minutos en agitación constante. Dependiendo del tipo de análisis a realizar, se emplearon distintos procesos posteriores a la electroforesis:

- Tinción con azul de Coomassie (determinación del peso molecular).

Al terminar la electroforesis, el gel se sumergió en una solución teñidora de azul de Coomassie por 24 horas en agitación constante. Después, se procedió a desteñir el gel con una solución desteñidora hasta que se observó la aparición de bandas color azul. Finalmente, se eliminó la solución excedente.

- Revelado de actividad enzimática (zimograma).

El gel, una vez lavado con el buffer, se sumergió en una solución de Tritón X-100 al 5% (v/v) por 30 minutos, Transcurrido el tiempo de lavado, el gel se volvió a sumergir en una solución de Tritón X-100 al 0.5% (v/v) en agitación constante por 24 horas a temperatura ambiente. Para visualizar la actividad enzimática en el gel, a éste se añadió una solución de acetato de  $\alpha$ -naftilo [3 mM] en 10% de acetona por 15 minutos en agitación constante y a temperatura ambiente. Después de los 15 minutos, se adicionó la solución de *FastRed* [1 mM] (sin eliminar la solución anterior) con 0.1% de Tritón, con el cual se reveló la actividad enzimática como una banda de color marrón.

### **6.9. Determinación de especificidad por sustrato, pH y temperaturas óptimas.**

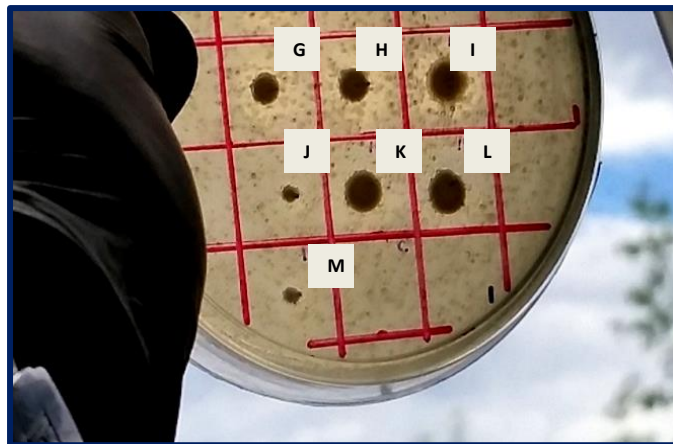
La especificidad por sustrato de la enzima recombinante se determinó usando *p*-nitrofenil (NF) ésteres de distinta longitud de cadena: *p*NF-acetato (C2:0), *p*NF-butirato (C4:0), *p*NF-octanoato (C8:0), *p*NF-decanoato (C10:0), *p*NF-dodecanoato (C12:0) y *p*NF-palmitato (C16:0). Se preparó una solución *stock* para cada sustrato utilizado; la concentración empleada fue de [1 mM]. El volumen final de reacción de cada ensayo fue de 200  $\mu$ L: 70  $\mu$ L del extracto intracelular + 20  $\mu$ L del sustrato evaluado [100  $\mu$ M] + 110  $\mu$ L de buffer de fosfatos [50 mM] estéril a pH 7.0. El tiempo de reacción para cada sustrato fue de 30 minutos, monitoreando su avance cada tres minutos mediante lecturas espectrofotométricas (EPOCH Biotech).

Los cálculos correspondientes para determinar la Actividad Específica de cada enzima se encuentran en la sección de Anexos 11.3. Una unidad de Actividad Enzimática se define como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol por minuto. Una vez determinado cuál fue el mejor sustrato de la enzima, se realizaron otros ensayos para evaluar a qué valores de pH y temperatura las enzimas presentan una máxima actividad enzimática. A partir de una solución *stock* [1mM] de *p*-nitrofenil butirato, se hizo la medición espectrofotométrica para estudiar la estabilidad de la enzima con diferentes soluciones amortiguadoras:  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  (pH 5),  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6 y 7) y TRIS-base (pH 8 y 9), todas a una concentración inicial de [0.5 M]. El volumen total de reacción fue de 200  $\mu\text{L}$ , similar a la reacción para determinar la especificidad por sustrato; 70  $\mu\text{L}$  del extracto intracelular + 20  $\mu\text{L}$  del sustrato [100  $\mu\text{M}$ ] + 110  $\mu\text{L}$  del buffer estéril utilizado, con una concentración final de [50 mM]. Al determinar a qué pH la enzima presenta mayor actividad frente al sustrato *p*-nitrofenil butirato, se analizó la actividad de ésta a tres diferentes temperaturas: 30°C, 40°C y 50°C. Se utilizó el Termomixer Eppendorf® para poder alcanzar la temperatura deseada. En este estudio, el volumen total de reacción también fue de 200  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: en un tubo Eppendorf® de 2.0 mL se añadió 70  $\mu\text{L}$  del extracto intracelular + 110  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos [50 mM] estéril a pH 7.0 y se colocaron dentro del Termomixer. Al transcurrir cada 10 minutos, se añadía 20  $\mu\text{L}$  del sustrato a la mezcla y se procedía a realizar la lectura espectrofotométrica. Los ensayos para cada temperatura fueron de treinta minutos. Todas las pruebas para evaluar cada parámetro se hicieron por triplicado. Para realizar el análisis estadístico de cada parámetro evaluado, se utilizó el programa *MiniTab Statistics 16*. Se hicieron anovas a una cola con un porcentaje de confiabilidad del 95%. Se utilizó el método *Tuckey* para la agrupación estadístico de los datos obtenidos.

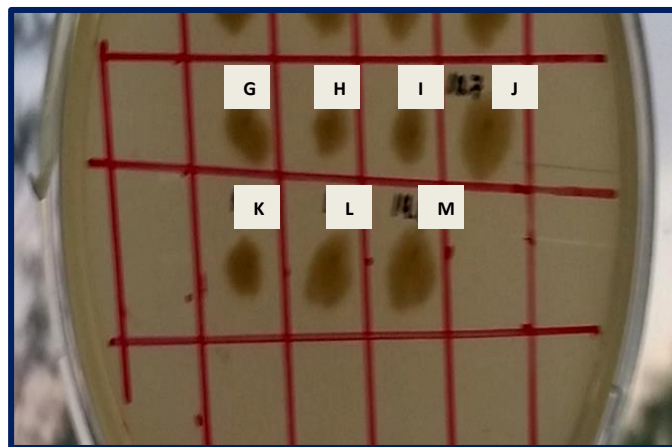
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Determinación de la actividad enzimática en cajas Petri.

Tras reactivar las clonas, se procedió a la inoculación de éstas en tres cajas Petri cuadradas (1.5 cm<sup>2</sup> por cada cuadrado), en donde cada clona fue sembrada por picadura en un cuadrante, con el objetivo de monitorear su crecimiento y ver en qué día empezaban a expresar la actividad esterasa. El medio empleado fue agar LB + KAN [50 µg/mL] + IPTG [0.4 mM] + Tributirina o Aceite de olivo al 1%. Se utilizaron estos dos sustratos con el objetivo de saber con qué tipo de sustrato las enzimas presentaban actividad; la tributirina es un sustrato que pueden hidrolizar las carboxilesterasas, mientras que el aceite de olivo solo puede ser hidrolizado por las lipasas. Una vez realizada la inoculación, éstas fueron incubadas en una estufa estática a 37°C por 7 días. Se monitoreó el crecimiento y la producción de la actividad esterasa mediante el desarrollo de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia, diariamente por 7 días. Al séptimo día, se midió el tamaño del halo y el tamaño de la colonia, se reportan los resultados como: diámetro del halo/ diámetro de la colonia ( $\theta$  halo/  $\theta$  colonia).



**Figura 7.1.** Demostración de la actividad esterasa en el medio de cultivo con tributirina al 1%



**Figura 7.2.** Demostración de la actividad lipolítica en el medio de cultivo con aceite de olivo al 1%



**Tabla 7.1.** Resultados obtenidos de la actividad observada en el medio de cultivo con tributirina

Clona	Promedio del tamaño de la colonia (mm)	Promedio del tamaño del halo (mm)	Relación $\left(\frac{\theta_{\text{halo}}}{\theta_{\text{colonia}}}\right)$
<b>G</b>	5.70	5.70	1.000
<b>H</b>	5.30	6.70	1.125
<b>I</b>	7.00	6.70	0.976
<b>J</b>	2.70	4.30	1.313
<b>K</b>	6.30	6.30	1.000
<b>L</b>	6.70	5.00	0.875
<b>M</b>	2.70	9.30	2.250

De acuerdo con la figura 7.1, se observó una actividad esterasa en la mayoría de las clonas inoculadas contra el sustrato tributirina con la formación de un halo de hidrólisis. En la Tabla 7.1 se muestra el tamaño de la colonia y el tamaño del halo producido. En la figura 7.2 se puede observar que no hubo presencia de actividad lipolítica contra el sustrato aceite de olivo, ya que no se desarrolló algún indicio de hidrólisis en este medio. Con estos resultados, la actividad presuntiva que presentaron las enzimas es típica de carboxilesterasas, al saber que éstas tienen una afinidad por sustratos de cadena corta.

### 7.2. Cuantificación de proteína en los contenidos celulares.

Se cuantificó la concentración de proteína mediante el método de Bradford en ambas preparaciones celulares. Los resultados obtenidos en ambos extractos se muestran en la Tabla 7.2.

**Tabla 7.2.** Concentración de proteína en el contenido intracelular y extracelular de cada clona.

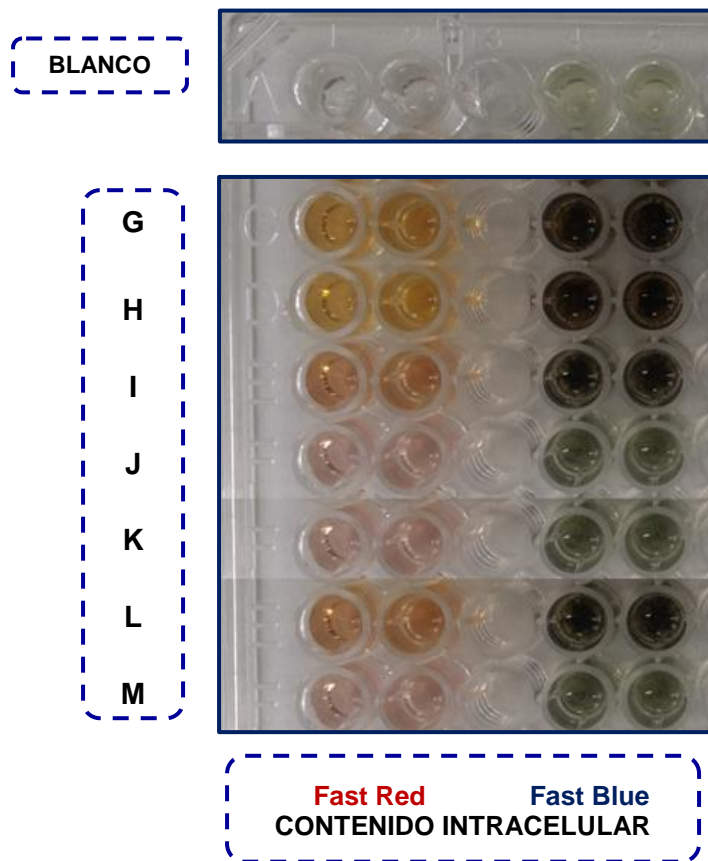
Clona	[Proteína total] <sub>intracelular</sub> (µg/mL)	[Proteína total] <sub>extracelular</sub> (µg/mL)
<b>G</b>	1,563.00 ± 0.22	12.26 ± 0.27
<b>H</b>	860.05 ± 0.41	14.85 ± 0.11
<b>I</b>	1,547.90 ± 0.36	21.54 ± 0.08
<b>J</b>	640.80 ± 1.32	16.88 ± 0.14
<b>K</b>	1,071.40 ± 0.29	24.09 ± 0.13
<b>L</b>	1,465.14 ± 0.48	17.35 ± 0.26
<b>M</b>	1,453.26 ± 0.09	24.67 ± 0.09

De acuerdo con estos datos, se observa que la concentración de proteína en la preparación intracelular es mucho mayor en comparación con la concentración en el sobrenadante extracelular en todas las clonas evaluadas. Por otra parte, con respecto a la producción de la proteína recombinante, se espera que ésta sea intracelular, debido a que el microorganismo

hospedero es *Escherichia coli*, y a que este microorganismo carece del algún péptido-senál que dirija a la proteína al exterior de la célula.

### 7.3. Evaluación de la actividad enzimática cualitativa en placa.

Para determinar la actividad en placa en la preparación intracelular, se realizó el método de identificación funcional basado en la hidrólisis de acetato de  $\alpha$ -naftilo. Se midió la intensidad de coloración que presentó cada extracto intracelular de la clona evaluada con el sustrato seleccionado por 20 minutos.

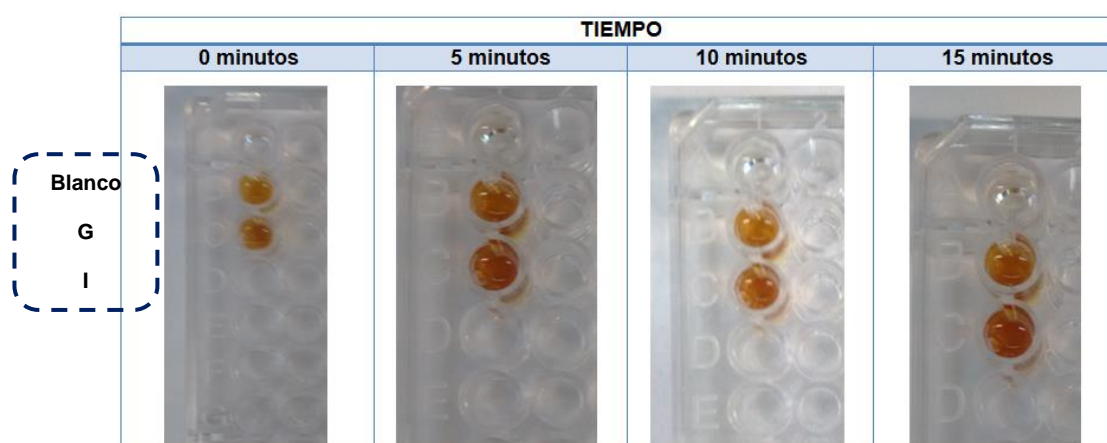


**Figura 7.3.** Actividad en placa con los reveladores *FastRed* y *FastBlue* de las clonas seleccionadas a 20 minutos.

En la figura 7.3 se observa la intensidad de coloración que mostraron cada uno de los extractos intracelulares de dichas clonas. El nivel de intensidad de coloración se comparó con un blanco, el cual es el medio de reacción descrito anteriormente, pero sin el extracto del contenido intracelular. Todas las clonas presentaron una actividad esterasa, ya que hubo un desarrollo de coloración en cada pozo en comparación con el blanco. Conforme transcurría el tiempo, la intensidad de la coloración aumentaba, haciendo más evidente que hubo actividad enzimática en el contenido intracelular, y que el nivel de éste fue alto.

Los resultados de los dos ensayos anteriores fueron la pauta para decidir que para los siguientes experimentos de este proyecto, solo se trabajaría con dos clonas, las clonas G e I, ya que éstas presentaron una mayor concentración de proteína a nivel intracelular y también mostraron una mayor actividad esterasa presuntiva en microplaca.

Para confirmar que las clonas seleccionadas presentaron una alta actividad enzimática a nivel intracelular, se comparó de manera cualitativa la coloración que éstas presentaban cada cinco minutos (en total fueron 15 minutos), en donde la coloración de cada clona fue intensa desde el minuto cero, aumentando de manera considerable mientras transcurría el tiempo seleccionado de análisis. Una vez transcurrido este tiempo, se comprobó que la coloración de ambas clonas fue elevado. El colorante que se empleó en este experimento fue *FastRed* (Figura 7.4).



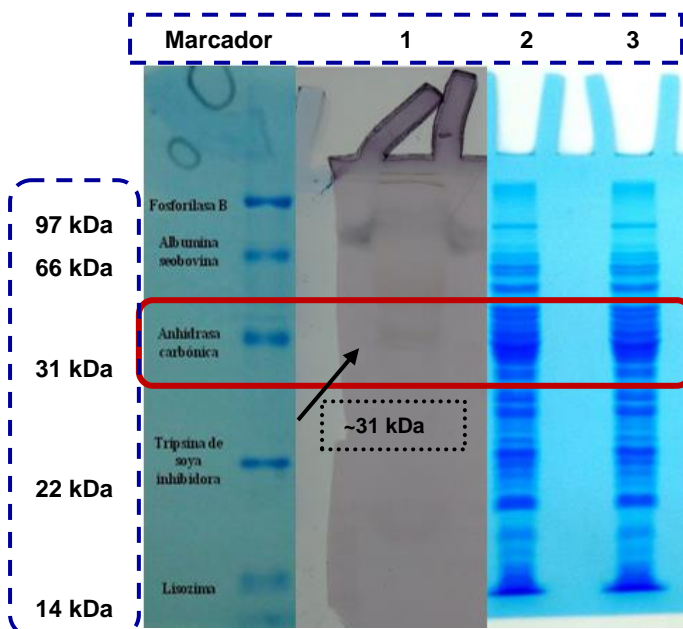
**Figura 7.4.** Actividad en placa con el revelador *Fast Red* de las clonas seleccionadas a distintos tiempos.

#### **7.4. Determinación del peso molecular y evaluación de actividad enzimática en zimogramas.**

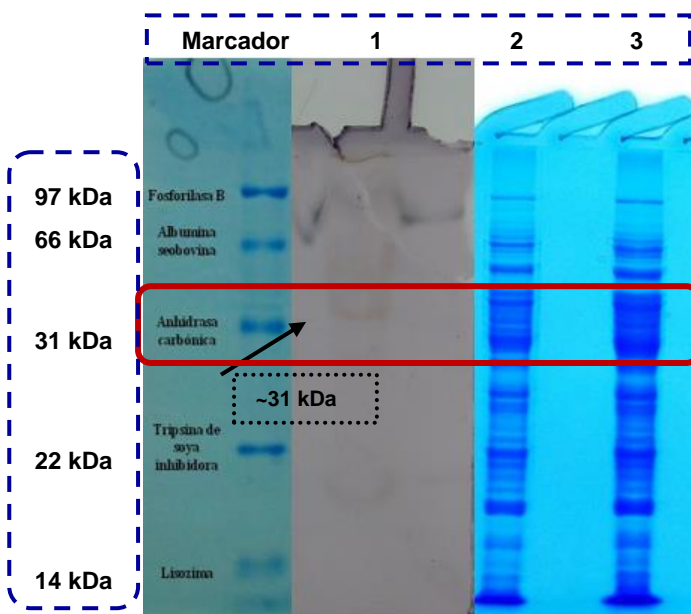
Para realizar la electroforesis de proteínas, se hicieron geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes. Se corrieron dos tipos de geles, uno teñido con azul de *Coomassie* y el otro revelado como Zimograma para visualizar las bandas con actividad esterasa.

En las figuras 7.5 y 7.6 se observan los geles obtenidos para cada clona. En el carril 1 de ambas figuras se puede observar la actividad enzimática de cada clona (zimograma), mientras que los carriles 2 y 3, se tiñeron con azul de *Coomassie*, las cuales (al compararlas con el marcador de bajo peso molecular) pesan alrededor de 31 kDa. En el recuadro rojo de cada figura se encuentran señaladas las bandas con actividad esterasa de cada clona. Se puede analizar que en ambas clonas se encuentran codificadas proteínas con pesos moleculares y actividades enzimáticas muy similares. Por otro lado, Torres-Rodríguez (2016) señala que hay codificadas proteínas hipotéticas reportadas en *Kocuria rhizophila* y *Leuconostoc mesenteroides* en las clonas seleccionadas.

El valor obtenido del peso molecular de estas enzimas coincide con algunos reportes encontrados en diversos artículos. Por ejemplo, Esteban-Torres, et al. (2014), se ha encargado de caracterizar diversas esterasas provenientes del microorganismo *Lactobacillus plantarum* (microorganismo que se encuentra en diversos alimentos fermentados), con un peso molecular muy similar a las esterasas de este proyecto.



**Figura 7.5.** Determinación del peso molecular de la enzima en el extracto intracelular de la clona **G**. Las bandas de actividad enzimática se muestran en el recuadro rojo.



**Figura 7.6.** Determinación del peso molecular de la enzima en el extracto intracelular de la clona **I**. Las bandas de actividad enzimática se muestran en el recuadro rojo.

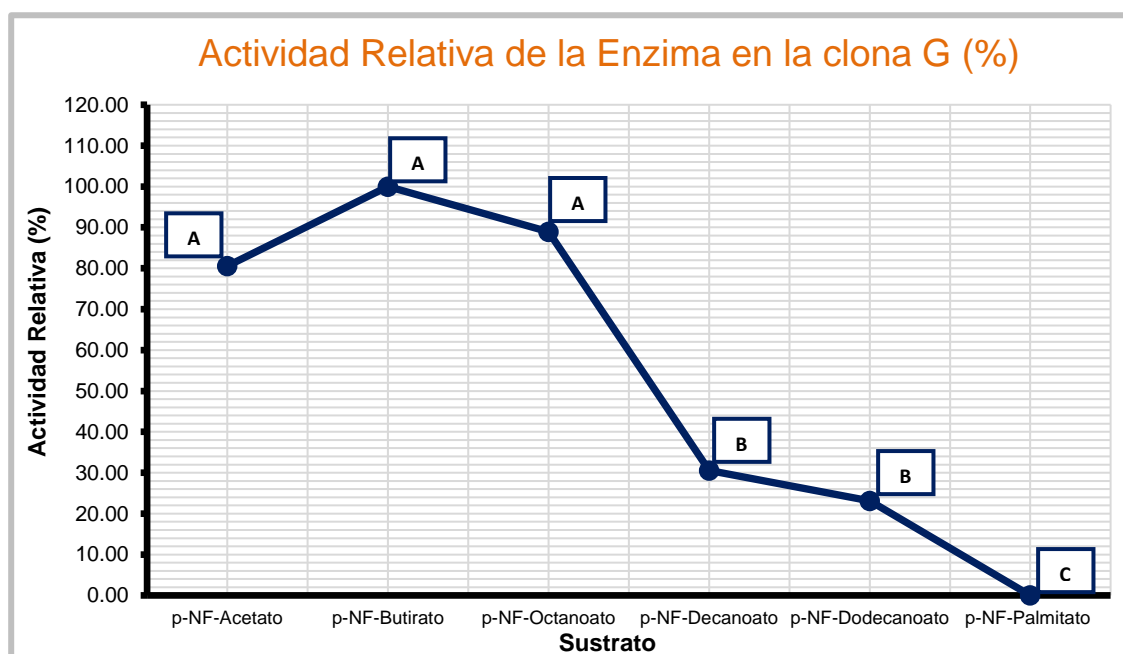
## 7.5 Determinación de especificidad por sustrato, pH y temperaturas óptimas de los contenidos intracelulares.

### 7.5.1. Especificidad por sustrato.

Se cuantificó la actividad esterasa por el método espectrofotométrico previamente descrito. Los sustratos utilizados fueron: *p*NF-acetato, *p*NF-butirato, *p*NF-octanoato, *p*NF-decanoato, *p*NF-dodecanoato. El cambio de absorbancia se midió a 420 nm y se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por minuto a temperatura ambiente y pH 7.0.

**Tabla 7.3.** Actividad Específica de la enzima en el contenido intracelular de la clona G con diferentes sustratos.

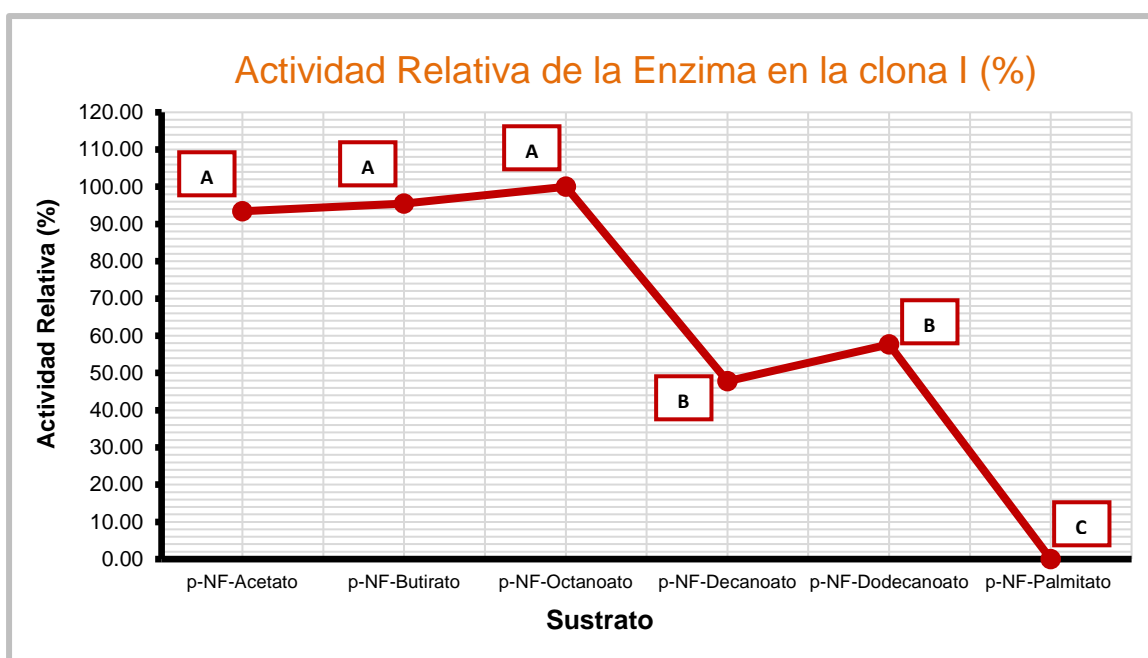
SUSTRATO	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg proteína)			PROMEDIO (U/mg proteína)	ACTIVIDAD RELATIVA (%)
	1	2	3		
<i>p</i> NF-acetato	$2.86 \times 10^{-4}$	$2.70 \times 10^{-4}$	$2.55 \times 10^{-4}$	$2.70 \times 10^{-4} \pm 1.55 \times 10^{-5}$	80.59%
<i>p</i> NF-butirato	$3.79 \times 10^{-4}$	$2.95 \times 10^{-4}$	$3.32 \times 10^{-4}$	$3.40 \times 10^{-4} \pm 4.20 \times 10^{-5}$	<b>100.0%</b>
<i>p</i> NF-octanoato	$3.01 \times 10^{-4}$	$2.61 \times 10^{-4}$	$3.32 \times 10^{-4}$	$2.98 \times 10^{-4} \pm 3.58 \times 10^{-5}$	88.95%
<i>p</i> NF-decanoato	$7.46 \times 10^{-5}$	$8.70 \times 10^{-5}$	$1.58 \times 10^{-4}$	$1.07 \times 10^{-4} \pm 4.53 \times 10^{-5}$	30.57%
<i>p</i> NF-dodecanoato	$3.42 \times 10^{-5}$	$6.21 \times 10^{-5}$	$1.46 \times 10^{-4}$	$8.10 \times 10^{-5} \pm 5.82 \times 10^{-5}$	23.14%
<i>p</i> NF-palmitato	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00%



**Figura 7.7.** Actividad relativa de la enzima en la fracción intracelular de la clona G hacia diferentes sustratos.

**Tabla 7.4.** Actividad Específica de la enzima en el contenido intracelular de la clona I con diferentes sustratos.

SUSTRATO	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg proteína)			PROMEDIO (U/mg proteína)	ACTIVIDAD RELATIVA (%)
	1	2	3		
p-NF-acetato	$1.04 \times 10^{-3}$	$8.36 \times 10^{-4}$	$6.83 \times 10^{-4}$	$8.52 \times 10^{-4} \pm 1.78 \times 10^{-4}$	93.42%
p-NF-butirato	$7.03 \times 10^{-4}$	$7.17 \times 10^{-4}$	$1.19 \times 10^{-3}$	$8.71 \times 10^{-4} \pm 2.78 \times 10^{-4}$	95.50%
p-NF-octanoato	$1.00 \times 10^{-3}$	$7.31 \times 10^{-4}$	$1.09 \times 10^{-3}$	$9.43 \times 10^{-4} \pm 1.88 \times 10^{-4}$	<b>100.0%</b>
p-NF-decanoato	$5.08 \times 10^{-4}$	$2.99 \times 10^{-4}$	$5.01 \times 10^{-4}$	$4.36 \times 10^{-4} \pm 1.19 \times 10^{-4}$	47.81%
p-NF-dodecanoato	$6.13 \times 10^{-4}$	$4.25 \times 10^{-4}$	$4.60 \times 10^{-4}$	$5.00 \times 10^{-4} \pm 1.00 \times 10^{-4}$	54.71%
p-NF-palmitato	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00%



**Figura 7.8.** Actividad relativa de la enzima en la fracción intracelular de la clona I hacia diferentes sustratos.

En la Tabla 7.3 se presentan los resultados obtenidos para la enzima en el contenido intracelular de la clona G, en donde se observa que ésta presentó una actividad enzimática máxima con los sustratos con longitud de cadena corta-mediana, C2 a C8; hubo una marcada disminución de la actividad con los sustratos C10 a C12 y no hubo indicios de actividad con el sustrato C16. En el caso de la enzima en el contenido intracelular de la clona I, los resultados se reportan en la Tabla 7.4; la actividad máxima se observa en el sustrato C8, seguido de los sustratos C4 y C2; mostrando una disminución en su actividad de C10 a C12 y, al igual que la enzima G, no mostró ninguna actividad con el sustrato C16.

Los resultados de este experimento se sometieron a un análisis estadístico (método de Fisher) para observar las diferencias que ambas enzimas mostraron frente a los sustratos evaluados. En las Figuras 7.7 y 7.8 se puede consultar la actividad relativa de ambas enzimas. En ambos casos, el agrupamiento fue similar, siendo el grupo **A** conformado por los sustratos de cadena corta-mediana (*p*NF-acetato, *p*NF-butirato y *p*NF-octanoato), los cuales fueron en donde se observó la mayor actividad en las dos enzimas evaluadas; dentro del grupo **B** se encuentran los sustratos *p*NF-decanoato y *p*NF-dodecanoato, y dentro del grupo **C**, *p*NF-palmitato, al no mostrar ninguna afinidad por este sustrato.

Existen diversas referencias en la literatura en donde se reportan comportamientos similares de esterasas en comparación con estas enzimas estudiadas. Ewis, et al. (2003) se encargó de caracterizar algunas esterasas provenientes del microorganismo *Geobacillus stearothermophilus*, en donde una de ellas también presentó una actividad máxima a sustratos de cadena corta-mediana (C2 a C8), al igual que la enzima G. También se ha demostrado la existencia de esterasas provenientes de otros ambientes. Por ejemplo; se han encontrado esterasas en *Pseudomonas citronellis*, en bacterias marinas como *Zunongwangia profunda* o en bacterias que se encuentran en diversos alimentos fermentados, como *Lactobacillus plantarum*, cuya afinidad por el sustrato *p*NF-butirato es mayor en comparación con otros sustratos. Estas enzimas, además mostraron una gran actividad a valores muy bajos de temperatura y a altos niveles de pH (Chao, et al., 2003; Rahman, et al., 2015; Esteban-Torres, et al., 2014).

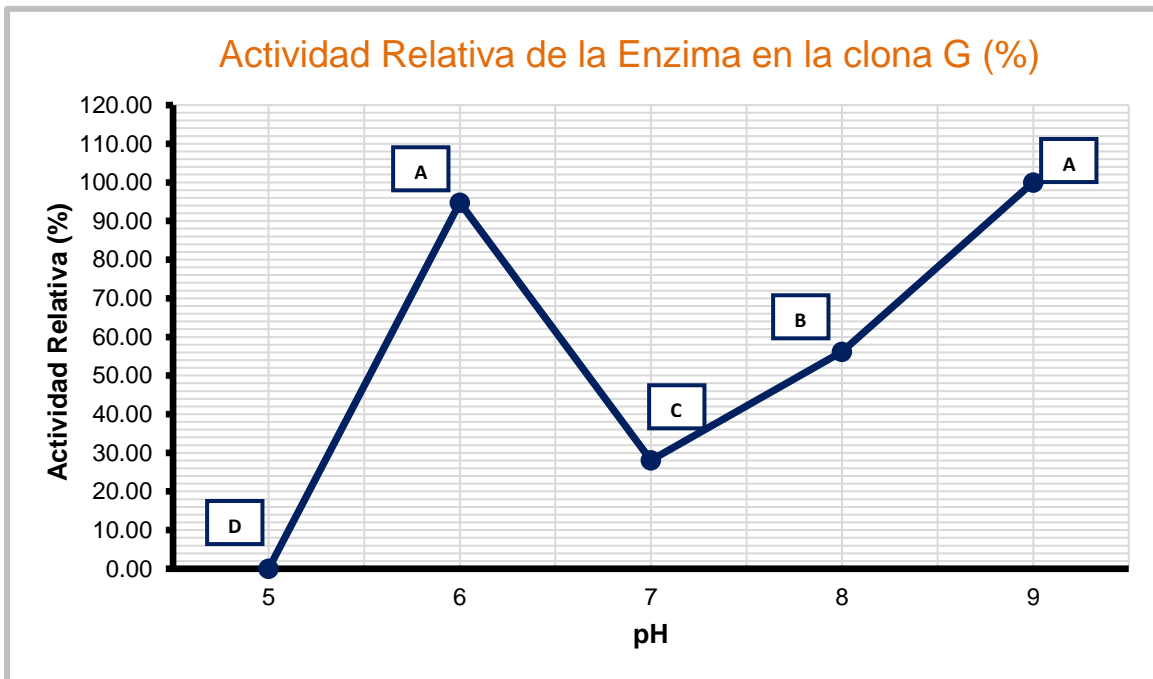
El comportamiento que manifestó cada enzima en este experimento indica que éstas pueden ser esterasas, ya que ambas enzimas presentaron afinidad por sustratos de cadena corta-mediana y su actividad disminuyó de manera considerable frente a sustratos de cadena larga.

### 7.5.2. Efecto del pH sobre la actividad enzimática.

El efecto del pH sobre la actividad de las enzimas se determinó en la fracción intracelular. Se varió el pH en un intervalo de 5.0 a 9.0. Para medir la actividad enzimática se utilizó el sustrato pNF-butirato. Se preparó una solución *stock* a una concentración de [1 mM]; posteriormente ésta se diluyó con buffer estéril con el pH a evaluar, a una concentración final de [0.1 mM]. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

**Tabla 7.5.** Actividad Específica de la enzima en el contenido intracelular de la clona G a diferentes valores de pH.

pH	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg proteína)			PROMEDIO (U/mg proteína)	ACTIVIDAD RELATIVA (%)
	1	2	3		
5.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00%
6.0	$5.00 \times 10^{-4}$	$5.50 \times 10^{-4}$	$5.80 \times 10^{-4}$	$5.42 \times 10^{-4} \pm 4.00 \times 10^{-5}$	94.73%
7.0	$1.60 \times 10^{-4}$	$1.60 \times 10^{-4}$	$1.70 \times 10^{-4}$	$1.65 \times 10^{-4} \pm 5.00 \times 10^{-6}$	28.07%
8.0	$3.20 \times 10^{-4}$	$3.40 \times 10^{-4}$	$2.90 \times 10^{-4}$	$3.20 \times 10^{-4} \pm 3.00 \times 10^{-5}$	56.14%
9.0	$6.10 \times 10^{-4}$	$5.20 \times 10^{-4}$	$5.70 \times 10^{-4}$	$5.70 \times 10^{-4} \pm 4.00 \times 10^{-5}$	<b>100.0%</b>

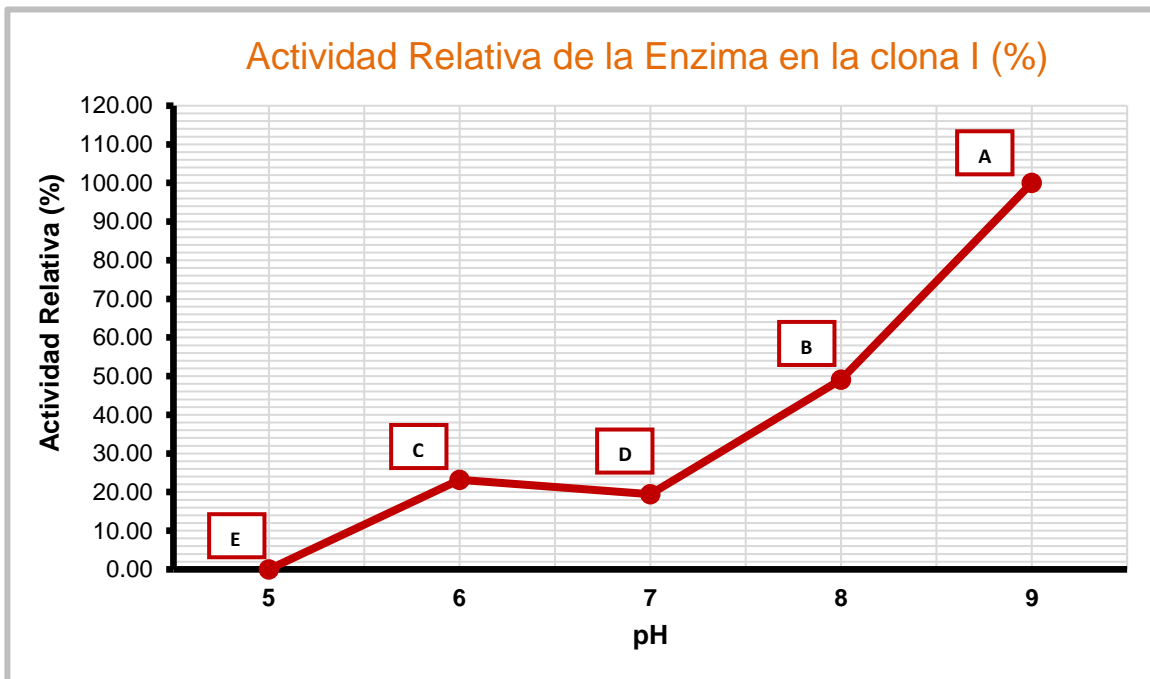


**Figura 7.9.** Comparación de la actividad relativa a diferentes valores de pH en la fracción intracelular de la clona G.



**Tabla 7.6.** Actividad Específica de la enzima en el contenido intracelular de la clona I a diferentes valores de pH.

pH	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg proteína)			PROMEDIO (U/mg proteína)	ACTIVIDAD RELATIVA (%)
	1	2	3		
5.0	$2.29 \times 10^{-3}$	$2.20 \times 10^{-3}$	$1.64 \times 10^{-3}$	0.000	0.00%
6.0	$2.30 \times 10^{-4}$	$2.60 \times 10^{-4}$	$2.60 \times 10^{-4}$	$2.55 \times 10^{-4} \pm 1.70 \times 10^{-5}$	23.15%
7.0	$2.10 \times 10^{-4}$	$2.10 \times 10^{-4}$	$2.20 \times 10^{-4}$	$2.14 \times 10^{-4} \pm 8.00 \times 10^{-6}$	19.44%
8.0	$5.40 \times 10^{-4}$	$5.50 \times 10^{-4}$	$4.90 \times 10^{-4}$	$5.30 \times 10^{-4} \pm 3.00 \times 10^{-5}$	49.07%
9.0	$1.10 \times 10^{-3}$	$1.07 \times 10^{-3}$	$1.08 \times 10^{-4}$	$1.08 \times 10^{-3} \pm 2.00 \times 10^{-5}$	<b>100.0%</b>



**Figura 7.10.** Comparación de la actividad relativa a diferentes valores de pH en la fracción intracelular de la clona I.

La enzima en el contenido intracelular de la clona G mostró una mayor actividad a dos valores de pH, 6.0 y 9.0, presentando un comportamiento bimodal (Tabla 7.5). Por otro lado, la enzima en el contenido intracelular de la clona I, exhibió una mayor actividad a pH 9.0 (Tabla 7.6).

Es importante resaltar que ambas enzimas no presentaron actividad a pH 5. Este resultado indica que estas enzimas pierden su actividad a un pH menor a 6.0. y que presentan mayor actividad a valores de pH cercanos a la neutralidad y basicidad.

Al igual que en el experimento anterior, se realizó un análisis estadístico (método *Fisher*), comparando los resultados obtenidos en ambas enzimas. En la Figura 7.9 se puede comparar la actividad relativa que mostró la clona G a los valores de pH evaluados. Dentro del grupo A están los valores de pH 6.0 y 9.0, que fue en donde la enzima exhibió la mayor actividad; en el

grupo **B** está en valor de pH 8; en el grupo **C**, pH 7; y en el grupo **D** se encuentra el valor de pH 5, en el cual no se observó alguna actividad a este valor de pH. Con respecto a la clona I, los resultados se pueden consultar en la Figura 7.10. El agrupamiento en esta clona fue diferente en comparación con la clona G, en donde se asignó una letra por cada valor de pH. El pH 9.0 se encuentra dentro del grupo **A**, los demás valores de pH, 8.0, 7.0, 6.0 y 5.0 se encuentran dentro de los grupos **B**, **D**, **C** y **E**, respectivamente.

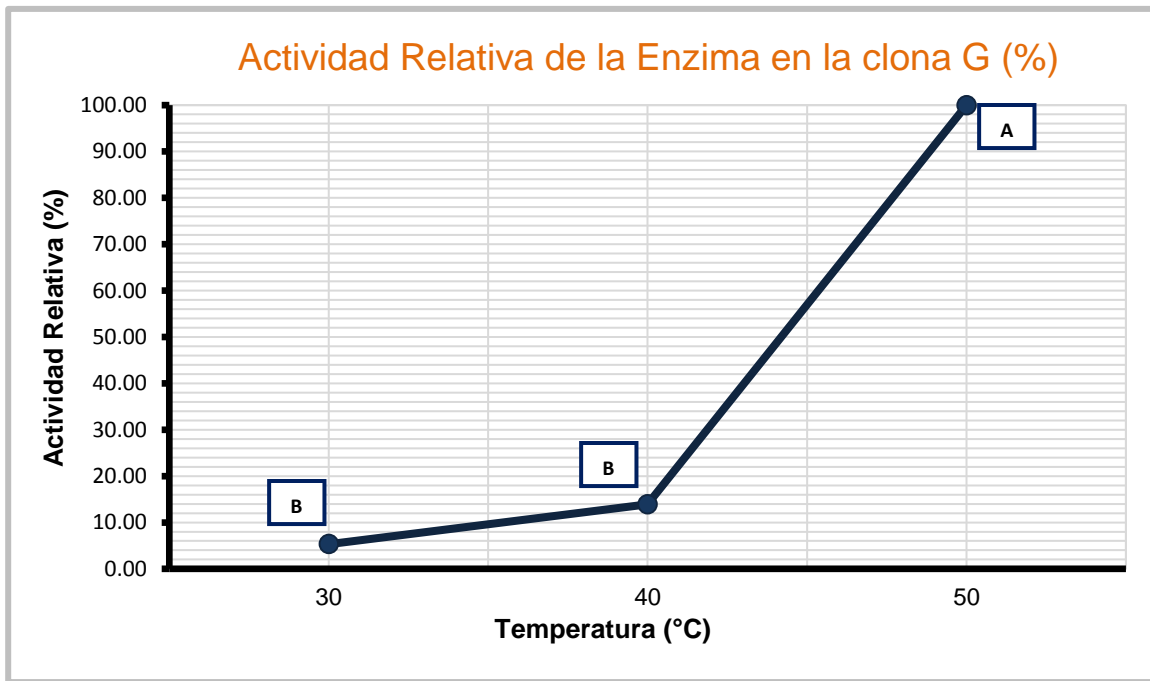
Las esterases provenientes de microorganismos generalmente presentan un pH óptimo entre 7.0 y 9.0 (Oakeshott, et al., 1997). Este comportamiento puede deberse al mecanismo hidrolítico que tienen este tipo de enzimas, en donde la triada catalítica requiere una histidina desprotonada para activar a la serina que se encuentra en el sitio activo (Matthews, et al., 2000). Se han reportado enzimas con una máxima actividad cercanas a este valor de pH. Dos esterases provenientes del microorganismo *Geobacillus stearothermophilus* (Est<sub>55</sub> y Est<sub>30</sub>) y otra esterasa proveniente de la manzana *Malus x domestica* (MdCXE1), la cual se encarga de sintetizar ésteres que dan el sabor característico a la manzana durante su proceso de maduración; presentaron una máxima actividad a un valor de pH de 9 (Ewis, et al., 2003; Souleyre, et al., 2010). El comportamiento de la enzima G es similar a una esterasa encontrada por Esteban-Torres, et al., (2014), la cual también mostró una gran actividad enzimática a pH 6. Con respecto a la enzima I, su comportamiento fue muy similar en comparación con la esterasa reportada por Dong, et al., (2015) mostrando una máxima actividad a un pH muy cercano a 9.0.

### 7.5.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

La evaluación de la actividad enzimática a diferentes temperaturas se realizó en un intervalo de 30°C a 50°C a pH 7.0 y con el sustrato pNF-butirato [1 mM].

**Tabla 7.7.** Actividad Específica de la enzima en el contenido intracelular de la clona G a diferentes valores de temperatura.

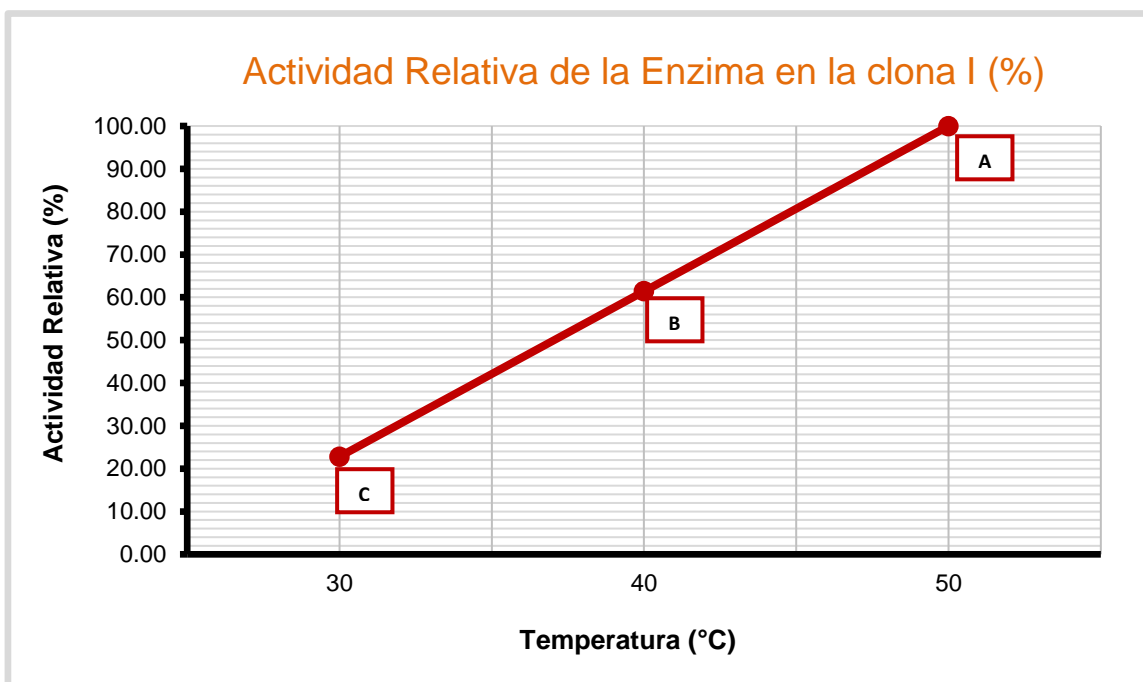
TEMPERATURA (°C)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg proteína)			PROMEDIO (U/mg proteína)	ACTIVIDAD RELATIVA (%)
	1	2	3		
30.0	$6.00 \times 10^{-6}$	$9.00 \times 10^{-6}$	$2.20 \times 10^{-5}$	$1.20 \times 10^{-5} \pm 8.00 \times 10^{-6}$	5.31%
40.0	$3.73 \times 10^{-5}$	$3.11 \times 10^{-5}$	$2.49 \times 10^{-5}$	$3.10 \times 10^{-5} \pm 6.00 \times 10^{-6}$	13.90%
50.0	$2.55 \times 10^{-4}$	$2.42 \times 10^{-4}$	$1.80 \times 10^{-5}$	$2.26 \times 10^{-4} \pm 4.00 \times 10^{-5}$	<b>100.0%</b>



**Figura 7.11.** Comparación de la actividad relativa de la fracción intracelular de la clona G a diferentes valores de temperatura.

**Tabla 7.8.** Actividad Específica y Actividad Relativa de la enzima en el contenido intracelular de la clona I a diferentes valores de temperatura.

TEMPERATURA (°C)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg proteína)			PROMEDIO (U/mg proteína)	ACTIVIDAD RELATIVA (%)
	1	2	3		
30.0	$2.10 \times 10^{-5}$	$3.50 \times 10^{-5}$	$2.10 \times 10^{-5}$	$2.60 \times 10^{-5} \pm 8.00 \times 10^{-6}$	22.81%
40.0	$9.05 \times 10^{-5}$	$7.66 \times 10^{-5}$	$4.18 \times 10^{-5}$	$7.00 \times 10^{-5} \pm 2.50 \times 10^{-6}$	61.40%
50.0	$1.04 \times 10^{-4}$	$1.32 \times 10^{-4}$	$1.04 \times 10^{-4}$	$1.14 \times 10^{-4} \pm 1.60 \times 10^{-5}$	<b>100.0%</b>



**Figura 7.12.** Comparación de la actividad relativa de la fracción intracelular de la clona I a diferentes valores de temperatura.

El efecto de la temperatura sobre la actividad esterasa para la clona G e I se pueden consultar en las Tablas 7.7 y 7.8, respectivamente. La enzima en la clona I presentó una mayor actividad enzimática en comparación con la otra clona. Ambas enzimas mostraron una mayor actividad enzimática a 50°C. Por otro lado, la actividad enzimática disminuyó de manera notable a 30°C en las dos enzimas, aunque este comportamiento fue más evidente en la clona G, disminuyendo casi por completo su actividad; mientras que a 40°C hubo un ligero aumento de actividad en las dos clonas, siendo en la clona I mucho más notorio.

Las actividades relativas de ambas enzimas a las diferentes temperaturas evaluadas se pueden examinar en las Figura 7.11 para la clona G y en la Figura 7.12, en el caso de la clona I. El análisis estadístico fue similar en las dos, conformando el grupo **A** para la temperatura de 50°C; grupo **B**, 40°C, y, por último, grupo **C**, el valor de 30°C.

Existen varias referencias que coinciden con los resultados obtenidos en este experimento, e incluso existen enzimas que muestran una máxima actividad a valores arriba de los 50°C. Se han encontrado esterases provenientes de microorganismos como *Bacillus subtilis* DR8806 (Asoodeh, et al., 2012) o en organismos multicelulares, como el hongo comestible *Sparassis crispa* (Chandrasekaran et al., 2010), cuya actividad máxima se registró a 50°C. También se han aislado esterases que han demostrado tener actividad enzimática a temperaturas mayores a 50°C. Por ejemplo, las esterases encontradas en microorganismos como *Bacillus licheniformis* S-86, *Anoxybacillus* sp. PDF1 o *Anoxybacillus gonensis* G2 presentan una actividad máxima a 60°C (Torres, et al., 2008; Ay, et al., 2011; Colak, et al., 2004).

Estas referencias son prueba de que las esterases pueden presentar una elevada actividad enzimática, e incluso ser estables a temperaturas no convencionales para la mayoría de las enzimas. Estas características las convierten en herramientas útiles para diversos procesos industriales. Por ejemplo, la esterase de *Bacillus licheniformis* S-86, además de ser termoresistente, es muy estable en presencia de solventes orgánicos, favoreciendo la síntesis de compuestos empleados en la industria de alimentos, principalmente, en medios de reacción no acuosos.

Por otro lado, Díaz-Vega (2016) también se encargó de analizar y caracterizar de manera bioquímica a dos enzimas provenientes de esta misma biblioteca metagenómica. Las proteínas contenidas en el extracto intracelular de estas dos clonas presentaron una actividad esterase, ya que ambas enzimas mostraron una mayor afinidad hacia el sustrato *p*-NF-butirato (C4:0). Con respecto a los otros parámetros evaluados, éstas presentaron una mayor actividad enzimática a pH 9.0 y a un valor de temperatura de 40°C. Los resultados reportados por Díaz-Vega (2016) son similares a los valores obtenidos en este proyecto, demostrando que en la biblioteca metagenómica existen genes que codifican para enzimas con una importante actividad esterase.

Es importante resaltar que en ambas clonas no hubo una desnaturalización completa de las enzimas estudiadas, registrándose una actividad enzimática a las tres temperaturas evaluadas. En forma general, las características mostradas en ambas preparaciones enzimáticas, es decir, la preferencia por sustratos de cadena corta-mediana y su actividad a pH alcalinos y temperaturas altas, las podrían convertir en herramientas útiles para diversos procesos industriales, principalmente biotecnológicos.

## 8. CONCLUSIONES

- Las clonas analizadas provenientes de una biblioteca metagenómica del queso Cotija artesanal madurado, presentaron una actividad esterasa.
- Las enzimas de ambas clonas se producen de forma intracelular.
- Las enzimas de ambas clonas presentaron un peso molecular aproximado de 31 kDa.
- El sustrato con los cuales se observó una mejor actividad enzimática fue *p*NF-butirato para la enzima de la clona G y *p*NF-octanoato en el caso de la enzima en la clona I.
- Las enzimas en ambas clonas mostraron una mayor actividad a pH 9.0.
- La temperatura a la cual las enzimas de ambas clonas mostraron una mayor actividad fue a 50°C.

## 9. PERSPECTIVAS

- Purificar las enzimas de ambas clonas.
- Efectuar otros ensayos con el objetivo de caracterizar de manera más profunda a ambas enzimas; efecto de metales, detergentes y/o inhibidores.
- Determinar su actividad frente a diferentes concentraciones de NaCl, con el objetivo de conocer si estas enzimas podrían ser útiles en la elaboración de diversos alimentos fermentados.
- Debido a la gran actividad que ambas enzimas presentaron a 50°C, realizar ensayos de temperatura óptima a valores arriba de 50°C y comparar si éstas podrían tener un comportamiento similar a esterasas aisladas de microorganismos termofílicos e hipertermofílicos.
- Realizar pruebas a temperaturas y valores de pH altos para prever un posible uso industrial.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Alcántara Sol, M.P., 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.

Álvarez, B.R., Barragán, L.E. y Chombo, M.P., 2005. **Reglas de uso. Marca colectiva Queso Cotija Región de Origen.** El Colegio de Michoacán, México.

Asoodeh, A., Ghanbari, T., 2012. **Characterization of an extracellular thermophilic alkaline esterase produced by *Bacillus subtilis* DR8806.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 85-86, pp. 49-55.

Ay, F., Karaoglu, H., Inan, K., Canakci, S., Belduz, A.O., 2011. **Cloning, purification and characterization of a thermostable carboxylesterase from *Anoybacillus* sp.** PDF1. *Protein Expression and Purification*, 80, pp. 74-79.

Barajas, R., Barragán, E., Chombo, P., 2005. **Reglas de uso. Queso Cotija Región de Origen.** Impreso en México.

Blackman, R.L., Spence, J.M., Field, L.M., Devonshire, A.L., 1995, **Chromosomal location of the amplified esterase genes conferring resistance to insecticides in *Mycus persicae*.** *Heredity*, 75, pp. 297-302

Bornscheuer, U.T., 2001, **Microbial carboxylesterases: Classification, properties and application in biocatalysis.** *Microbiology Review*, 26, pp. 73-81

Bornscheuer, U.T., Kazlauska, R.J., 2006. **Hydrolases in organic synthesis: Regio- and stereoselective Biotransformation.** Segunda Edición. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim. Pp. 61-74.

Chandrasekaran, G., Joong-Geun, K., Hyun-Jae, S., 2010. **Purification and characterization of an alkaliphilic esterase from a culinary medicinal mushroom, *Sparassis crispa*.** *Food Chemistry*, 124, pp. 1376-1381.



Chao, Y.P., Fu, H., Wang, Y.L., Huang, W.B., Wang, J.Y., 2003, **Molecular cloning of the carboxylesterase gen and biochemical characterization of the encoded protein from *Pseudomonas citronellis* ATCC 13674.** *Research in Microbiology*, 154, pp. 521-526.

Colak, A., Sisik, D., Saglam, N., Guner, S., Canakci, S., Belduz, A.O., 2004, **Characterization of a thermoalkaliphic esterase from a novel thermophilic bacterium, *Anoxybacillus gonensis* G2.** *Bioresource Technology*. 96, pp. 625-631.

Del Moral, S., Ramírez-Coutiño, L.P., García-Gómez, M.J., 2015. **Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de alimentos.** *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2, pp. 87-102.

Díaz Vega, C.M., 2016, **Caracterización de la actividad lipolítica de clonas de una biblioteca metagenómica obtenida del queso Cotija artesanal madurado.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Dong, J., Zhao, W., Gasmalla, M.A.A., Sun, J., Hua, X., Zhang, W., Han, L., Fan, Y., Feng, Y., Shen, Q., Yang, R., 2015. **A novel extracellular cold-active esterase of *Pseudomonas* sp. TB11 from glacier No.1. Differential induction, purification and characterisation.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 121, pp. 53-63.

Esteban-Torres, M., Santamaría, L., de las Rivas, B., Muñoz, R., 2014. **Characterisation of a cold-active and salt-tolerant esterase from *Lactobacillus plantarum* with potential application during cheese ripening.** *International Dairy Journal*, 39, pp. 312-315.

Esteban-Torres, M. Mancheño, J.M., de las Rivas, B., Muñoz, R., 2014. **Characterization of a cold-active esterase from *Lactobacillus plantarum* suitable for Food Fermentations.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, pp. 5126-5132.

Ewis, H.E., Abdelal, A.T., Lu, C.D., 2003. **Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxylesterases from *Geobacillus stearothermophilus*.** *International Journal on Genes and Genomes*, 329, pp. 187-195.

Ferreira, L.M., Wood, T.M., Williamson, G., Faulds, C., Haslewood, G.P., Black, G.W., Gillbert, H.J., 1993. **A modular esterase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulose* contains a non-catalytic cellulose-binding domain.** *Biochemical Journal*. 294, pp. 349-355.

Ferrer, M., Beloqui, A., Timmisk, K., Golyshin, P., 2009. **Metagenomics for mining new genetics resources of microbial communities.** *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 16, pp. 109-123.

Fox, P., Guinee, T., Cogan, T., Paul, L., 2000. **Fundamentals of Cheese Science.** USA: Aspen Publication.

García Saturnino. V., 2006. **Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso Cotija.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

García Saturnino. V., 2011. **Detección de microorganismos lipolíticos durante las etapas de elaboración de un queso artesanal mediante técnicas moleculares.** Tesis de Maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. UNAM

García, T., Coteron, A., Martínez, M., Aracil, J., 2000, **Kinetic modeling of esterification reactions catalysed by immobilized lipase.** *Chemical Engineering Science*, 51, pp. 2841-2846.

Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., Goodman, R.M., 1998. **Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products.** *Chemistry & Biology*. 10, pp. R245-R249

Hernández Briones, V. 2010. **Composición nutrimental de queso Cotija Región de Origen en función de condiciones de producción y maduración.** Tesis de Maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas. UNAM.

Haug, A., Hostmark, A.T., Harstard, O.M., 2007. **Bovine milk in human nutrition. A review.** *Lipids in Health and Disease*. 6, pp. 1-25.

International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology.** 2017. [En línea]. (Actualizado al día 7 de agosto del 2017). Disponible en: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>.

Jaeger, K.E., Dijkstra B.W., Reetz M.T., 1999. **Bacterial biocatalysis: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases.** *Annual Reviews of Microbiology*. 53, pp. 315-351.

Jaeger, K.E., Reetz, M.T., 1998. **Microbial lipases form versatile tools for biotechnology.** *Annual Reviews of Microbiology*. 16, pp. 396-403.

Karp, G., 2009. **Biología Celular y Molecular. Conceptos y Experimentos.** Quinta edición. Ciudad de México: Mc Graw Hill.

Klug, S.W. y Cummings. R.M., 1999. **Conceptos de Genética.** Quinta edición. Madrid: Prentice Hall.

Laemmli, U. K. 1970. **Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4.** *Nature*, 227, pp. 680-685.

Lee, B.H., 1996. **Fundamentals of Food Biotechnology.** Segunda Edición, United Kingdom: Wiley Blackwell

López-Munguía, A. y Quirasco Baruch, M., 2006. **Enzimas.** En: Badui, S. *Química de los Alimentos.* Cuarta Edición. Ciudad de México: Pearson-Addison, pp. 302.

Marilley, L., Casey, M., 2004. **Flavour of cheese products. Methabolic pathway, analytical tools and identification of producing strains.** *International Journal of Food Microbiology*. 90, pp. 139-159.

Matthews, C.K., Van Holde, K.E. y Ahern, K.G., 2000. **Biochemistry.** Nueva York: Addison-Wesley Publishing Company

McQueen, D.A.R., Schottel, J.L., 1987. **Purification and characterization of a novel extracellular esterase from pathogenic *Streptomyces scabies* that induced by zinc.** *Journal Bacteriology*, 169, pp. 1967-1971.

Oakeshott, J.G., Collet, C., Phillis, R.W., Nielsen, K.M., Russell, R.J., Chambers, G.K., Ross, V., Richmond, R.C., 1997. **Molecular cloning and characterization of esterase-6, a serine hydrolase of *Drosophila*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84, pp. 3359-3363.

Peña Montes, C. 2009. **Análisis de la expresión y caracterización de la esterasa StcI involucrada en la biosíntesis de esterigmatocistina en *Aspergillus nidulans***. Tesis de Doctorado. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas. UNAM.

Pomeón, T., Consultoría realizada para la FAO y el IICA en el marco de estudio conjunto sobre los productos de calidad vinculada al origen. 2007. **El queso Cotija, México: un producto con marca colectiva queso “Cotija Región de Origen”, en proceso de adquisición de una Denominación de Origen**. [En línea]. (Actualizado al noviembre de 2007). Disponible en: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/olq/documents/Santiago/Documentos/Estudios%20de%20Ocaso/Cotija/Queso\\_COTIJA\\_Mexico.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/olq/documents/Santiago/Documentos/Estudios%20de%20Ocaso/Cotija/Queso_COTIJA_Mexico.pdf)

Prim, N., Blanco, A., Martínez, J., Pastor, F.I.J, Díaz, P., 1992, ***Est A*, a gene coding for a cell-bound esterase from *Paenibacillus sp.* BP-23, is a new member of the bacterial subclass of type B carboxylesterases. *Research in Microbiology*, 151, pp. 303-312.**

Rahman, M.A., Culsum, U., Tang, W., Zhang, S.W., Wu, G., Liu, Z., 2015. **Characterization of a novel old active and salt tolerant esterase from *Zunongwangia profunda***. *Enzyme and Microbial Technology*. 85, pp. 1-11.

Riesenfeld, C.S., Schloss P.D., Handelsman J., 2004, **Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. *Annual Review of Genetics*, 38, pp. 525-552.**

Schlimme, E., 2002. **La leche y sus componentes. Propiedades físicas y químicas**. Zaragoza: ACRIBIA.

Smith, J.E., 2004. **Biotechnology**. Cuarta Edición. United Kingdom: The Press Syndicate of the University of Cambridge;

Souleyre, E.J.F., Marshall, S.D.G., Oakeshott, J.G., Russell, R.J., Plummer, K.M., Newcomb, R. D., 2010, **Biochemical characterisation of MdCXE1, a carboxylesterase from Apple that is expressed during fruit fermentation. *Phytochemistry*, 72, pp. 564-571.**

Torres, S., Baigorí, M.D., Swathy, S.L., Pandey, A., Castro, G.R., 2008, **Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase. *Food Research International*, 42, pp. 454-460.**

Torres Rodríguez, I. 2016. **Identificación funcional de esterasas en un banco metagenómico del queso Cotija**. Tesis de maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.

Uppenberg, J., Patkar, S., Bergfors, T., Jones, A.T., 1994. **Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida Antarctica***. *Journal of Molecular Biology*. 253, pp. 790-792.

Whitaker, J.R., 2000. **Enzimas**. En: Fennema, O.R., *Química de los Alimentos*. Segunda Edición. Madrid: Acribia, pp. 547-551.

## 11. ANEXOS

### 11.1. Preparación de reactivos y medios de cultivo

#### Kanamicina [50mg/mL]

Sustancias	Cantidad para 10 mL
Sulfato de Kanamicina (Sigma Aldrich)	500.0 mg
Agua (Grado BM)	10.0 mL

#### Preparación:

1. Disolver el sulfato de kanamicina en el volumen de agua (grado BM) a ocupar.
2. Esterilizar la solución mediante filtración (Millex. Tamaño del poro: 0.22  $\mu$ m).
3. Almacenar en tubos Eppendorf® de 2.0 mL a -20°C.

**Nota:** La kanamicina es un antibiótico fotosensible, por lo que es importante cubrir cada tubo Eppendorf® con papel aluminio, con el fin de protegerlo de la luz.

#### IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-Tiogalactopiranosido) [100 mM]

Sustancias	Cantidad para 20 mL
IPTG (Sigma Aldrich)	0.48 g
Agua (Grado BM)	20.0 mL

#### Preparación:

4. Disolver el IPTG en el volumen de agua (grado BM) a ocupar.
5. Esterilizar la solución mediante filtración (Millex. Tamaño del poro: 0.22  $\mu$ m).
6. Almacenar en tubos Eppendorf® de 2.0 mL a -20°C

#### Caldo LB + KAN [50 $\mu$ m] + IPTG [0.4 mM]

Sustancias	Cantidad para 500 mL
Bacto-triptona	5.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
Kanamicina [50 mg/mL]	500.0 $\mu$ L
IPTG [100 mM]	2.0 mL

#### Preparación:

1. Realizar los cálculos correspondientes para preparar la cantidad deseada.
2. Disolver todos los componentes en polvo (con excepción de la KAN e IPTG) en la mitad del volumen de agua desionizada y filtrada a ocupar.
3. Aforar la solución a la cantidad calculada.
4. Ajustar el pH del medio de cultivo a 7.5.

5. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
6. Una vez esterilizado, enfriar a temperatura ambiente.
7. Añadir la cantidad de KAN e IPTG calculados, tal que su concentración final sea de [50 µg/mL] y [0.4 mM], respectivamente.

#### **Agar LB-Tributirina/Aceite de Olivo + KAN [50 µg/mL] + IPTG [0.4 mM]**

<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad para 1000 mL</b>
Bacto-triptona	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Tributirina o Aceite de Olivo	10.0 mL
Agar microbiológico	15.0 g
KAN [50 mg/mL]	1000.0 µL
IPTG [100 mM]	4.0 mL

#### **Preparación:**

1. Realizar los cálculos correspondientes para preparar la cantidad deseada.
2. Disolver todos los componentes en polvo (con excepción de la KAN e IPTG) en la mitad del volumen de agua desionizada y filtrada a ocupar.
3. Adicionar el sustrato a evaluar y emulsificar a velocidad mínima por un periodo de tiempo de 2 a 3 minutos.
4. Adicionar el volumen de agua desionizada faltante.
5. Ajustar el pH del medio de cultivo a 7.5.
6. Añadir el agar microbiológico y homogeneizar toda la solución.
7. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.
8. Enfriar a “temperatura corporal” y añadir la kanamicina y el IPTG.
9. Distribuir el medio en cajas Petri de manera uniforme en una campana de flujo laminar de uso microbiológico.
10. Dejar enfriar hasta que el medio se encuentre solidificado.
11. Almacenar los medios en refrigeración hasta su uso.

#### **Buffer de Fosfato de Potasio [100 mM] a pH 7.5**

<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad para 1000 mL</b>
Fosfato de Potasio Monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2.3 g
Fosfato Dipotásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	14.5 g
Agua desionizada y filtrada	1000.0 mL

**Preparación:**

1. En la mitad del volumen de agua desionizada a ocupar, añadir  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , y disolver.
2. Ajustar el pH de la solución a 7.5.
3. Agregar el volumen de agua desionizada faltante.
4. Esterilizar en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos.
5. Enfriar a temperatura ambiente.
6. Almacenar a  $4^\circ\text{C}$

**Solución de lisis**

Sustancia	Cantidad para 200 mL
Cloruro de Sodio (NaCl)	2.5 g
Glicerol	20.0 mL
EDTA (Ácido Etilendiaminotetracético)	74.4 mg
Buffer de Fosfato de Potasio [50 mM] pH 7.5	180.0 mL

**Preparación:**

1. En la mitad de volumen de buffer de fosfatos [50 mM] a ocupar, disolver el EDTA y NaCl.
2. Añadir el glicerol y disolver.
3. Agregar el volumen de buffer de fosfatos [50 mM] faltante.
4. Disolver de manera uniforme y almacenar en refrigeración.

**Acetato de  $\alpha$ -naftilo [3 mM]**

Sustancia	Cantidad para 10 mL
Acetato de $\alpha$ -naftilo (Sigma Aldrich)	5.6 mg
Acetona ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ )	1.0 mL
Buffer de Fosfatos de Potasio [100 mM] a pH 7.5	9.0 mL

**Preparación:**

1. Disolver el acetato de  $\alpha$ -naftilo en acetona.
2. Añadir el buffer de fosfatos de K [100 mM] pH 7.5 y disolver.
3. Almacenar en refrigeración.

**Reactivo Revelador *FastRed* [1 mM] y *FastBlue* [1 mM]**

Sustancia	Cantidad para 10 mL
<i>FastRed</i> (Sigma Aldrich)	2.75 mg
<i>FastBlue</i> (Sigma Aldrich)	3.88 mg
Tritón X-100 (Sigma Aldrich)	10.0 $\mu\text{L}$



**Preparación:**

1. Disolver el revelador que se vaya a emplear (*FastRed* o *FastBlue*) en la cantidad de buffer de fosfato de potasio [100 mM] pH 7.5 a utilizar.
2. Adicionar el Tritón X-100.
3. Homogeneizar.

**Solución de Acrilamida al 30%**

Sustancia	Cantidad para 100 mL
Acrilamida	29.2 g
Bis-acrilamida	0.8 g
Agua desionizada, filtrada y estéril	100.0 mL

**Preparación:**

1. Realizar los cálculos correspondientes para preparar la cantidad deseada.
2. Pesar la acrilamida. **¡CUIDADO!**: La acrilamida es una sustancia muy tóxica. Para pesarla, se recomienda usar una máscara para proteger las vías respiratorias y que no se encuentren personas alrededor de quien esté pesando este reactivo.
3. Pesar la Bis-acrilamida.
4. Disolver con la cantidad de agua calculada.
5. Almacenar a 4°C en un frasco ámbar. No debe de ser expuesto a la luz.

**Reactivo Tris-HCl [1.5 M] a pH 8.8**

Sustancia	Cantidad para 100 mL
Tris-Base (Biorad)	18.15 g
Agua desionizada y filtrada	100.0 mL

**Preparación:**

1. Realizar los cálculos correspondientes para preparar la cantidad deseada.
2. Pesar el reactivo Tris-Base.
3. Disolver con la cantidad de agua desionizada y filtrada a ocupar.
4. Ajustar a pH 8.8 y almacenar a 4°C

### Reactivo Tris-HCl [0.5 M] pH 6.8

Sustancia	Cantidad para 100 mL
Tris-Base (Biorad)	6.0 g
Agua desionizada y filtrada	100.0 mL

#### **Preparación:**

1. Realizar los cálculos correspondientes para preparar la cantidad deseada.
2. Pesar el reactivo Tris-Base y disolver con la cantidad de agua desionizada y filtrada a ocupar.
3. Ajustar a pH 6.8.
4. Disolver de manera uniforme y almacenar a 4°C

### SDS al 10%

Sustancia	Cantidad para 100 mL
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	10.0 g
Agua desionizada y filtrada	100.0 mL

#### **Preparación:**

1. Realizar los cálculos correspondientes para preparar la cantidad deseada.
2. Pesar el reactivo SDS. **Nota:** se recomienda el uso del cubrebocas cuando se pese este compuesto.
3. Disolver en la cantidad de agua desionizada calculada y almacenar a temperatura ambiente.

### APS al 10%

Sustancia	Cantidad para 10 mL
Persulfato de amonio (APS)	1.0 g
Agua desionizada o destilada	10.0 mL

#### **Preparación:**

1. Realizar los cálculos correspondientes para preparar la cantidad deseada.
2. Pesar el reactivo APS y disolver en la cantidad de agua desionizada deseada.
3. Almacenar en refrigeración a 4°C.

### Buffer de Carga

Sustancia	Cantidad para 10 mL
Tris-HCl [0.5 M] pH 8.0	1.25 mL
Glicerol al 100%	2.5 mL
SDS al 10%	2.0 mL
Azul de bromofenol al 0.5%	0.2 mL
Agua desionizada, filtrada y estéril	3.55 mL

#### Preparación:

1. Pesar los reactivos y disolver en la cantidad de agua desionizada a emplear.
2. Almacenar en alícuotas de 1.0 mL en tubos Eppendorf® a 4°C

### Buffer de corrida (10X)

Sustancia	Cantidad para 500 mL
Tris-base	15.0 g
Glicina	5.0 g
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	72.0 g
Agua desionizada, filtrada y estéril	500.0 mL

#### Preparación:

1. Realizar los cálculos correspondientes para preparar la cantidad deseada.
2. Añadir los reactivos en la cantidad de agua desionizada deseada (usar cubrebocas para pesar el SDS).
3. Ajustar a pH 5.3 y disolver de manera uniforme.
4. Almacenar a temperatura ambiente.

### Gel SDS-PAGE

Sustancias	Cantidad para 1 gel	
	Gel separador 12 %	Gel concentrador 4%
Agua desionizada	3.5 mL	3.05 mL
Tris-HCl [1.5 M] pH 8.8	2.5 mL	-----
Tris-HCl [0.5 M] pH 6.8	-----	1.25 mL
SDS 10%	100.0 µL	50.0 µL
Acilamida 30%	4.0 mL	0.67 mL
APS 10%	50.0 µL	25.0 µL
TEMED	5.0 µL	5.0 µL

#### Equipo:

- Placas de vidrio o *short plates*.
- Espaciadores de 1.5 mm.
- Cámara de electroforesis y cámara de poder.

**Preparación:**

1. Se realizan los cálculos correspondientes de cada componente para la cantidad de geles que se desean preparar.
2. Limpiar con etanol cada vidrio o *short plate* a ocupar.
3. Ensamblar los moldes contenedores del gel.
4. Preparar primero el gel separador.
  - 4.1. Mezclar en un tubo Falcon® de 50.0 mL completamente limpio, todas las sustancias con excepción del APS 10% y TEMED.
  - 4.2. Añadir el APS 10% y el TEMED.
  - 4.3. Vaciar la mezcla al molde contenedor del gel lo más rápido posible.
  - 4.4. Añadir un poco de alcohol etílico o alcohol isoamílico en la superficie del contenedor del gel con la finalidad de eliminar burbujas que pudieran formarse.
  - 4.5. Esperar a que éste gelifique (entre 15 y 20 minutos).
5. Preparar el gel concentrador:
  - 5.1. Mezclar en un tubo Falcon® de 50.0 mL completamente limpio, todas las sustancias con excepción del APS 10% y TEMED.
  - 5.2. Añadir el APS 10% y el TEMED.
  - 5.3. Vaciar la mezcla al molde contenedor del gel lo más rápido posible.
  - 5.4. Introducir el peine formador de carriles.
  - 5.5. Esperar a que éste gelifique (entre 15 y 20 minutos).
6. Montar el gel en la cámara de electroforesis.
7. Añadir el buffer de carga a una concentración de 1X.
8. Cargar con mucho cuidado las muestras y el marcador del gel.
9. Hacer pasar una corriente eléctrica de 120 V hasta que el frente de corrida salga del gel.

**Solución teñidora de Azul de Coomassie**

Sustancia	Cantidad para 100 mL
Azul de Coomassie G-250 (Biorad)	100.0 mg
Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	25.0 mL
Ácido Acético Glacial (CH <sub>3</sub> COOH)	5.0 mL
Agua desionizada y filtrada	100.0 mL

**Preparación:**

1. Disolver el Azul de Coomassie G-250 en el metanol.
2. Adicionar el Ácido Acético Glacial y el agua desionizada.
3. Almacenar a temperatura ambiente.

### Solución desteñidora

Sustancia	Cantidad para 100 mL
Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	10.0 mL
Ácido Acético Glacial (CH <sub>3</sub> COOH)	10.0 mL
Agua desionizada y filtrada	100.0 mL

#### **Preparación:**

1. Disolver el metanol, el ácido acético glacial y el agua desionizada.
2. Almacenar a temperatura ambiente.

### Buffer de Acetatos [0.5 M] (pH 5.0)

Sustancia	Cantidad para 200 mL
Acetato de Sodio (CH <sub>3</sub> COONa)	8.18 g
Ácido Acético Glacial (CH <sub>3</sub> COOH)	2.18 mL
Agua desionizada y filtrada	197.82 mL

#### **Preparación:**

1. Disolver el CH<sub>3</sub>COONa en el volumen de agua desionizada y filtrada a ocupar.
2. Añadir el CH<sub>3</sub>COOH glacial y disolver.
3. Ajustar el pH a 5.0.
4. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
5. Enfriar a temperatura ambiente y almacenar a 4°C.

### Buffer de Fosfato de Potasio [0.5 M] (pH 6.0)

Sustancia	Cantidad para 200 mL
Fosfato de Potasio Monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	11.7 g
Fosfato Dipotásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.44 g
Agua desionizada y filtrada	200.0 mL

#### **Preparación:**

1. Disolver KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en el volumen de agua desionizada y filtrada a ocupar.
2. Ajustar el pH a 6.0.
3. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
4. Enfriar a temperatura ambiente y almacenar a 4°C.

### **Buffer de Fosfato de Potasio [0.5 m] (pH 7.0)**

<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad para 200 mL</b>
Fosfato de Potasio Monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	5.18 g
Fosfato Dipotásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	10.46 g
Agua desionizada y filtrada	200.0 mL

#### **Preparación:**

1. Disolver KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en el volumen de agua desionizada y filtrada a ocupar.
2. Ajustar el pH a 7.0.
3. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
4. Enfriar a temperatura ambiente y almacenar a 4°C.

### **Buffer Tris-Base [0.5 M] (pH 8.0 ó 9.0)**

<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad para 200 mL</b>
Tris Base (BioRad)	12.12 g
Agua desionizada y filtrada	200.0 mL

#### **Preparación:**

1. Disolver el Tris-Base en el volumen de agua desionizada y filtrada a ocupar.
2. Ajustar el pH a 8.0 ó 9.0.
3. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
4. Enfriar a temperatura ambiente y almacenar a 4°C.

### **p-Nitrofenol [1 mM]**

<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad para 1 mL</b>
p-Nitrofenol (Grado Espectrofotométrico)	0.14 mg
Alcohol absoluto	1.0 mL

#### **Preparación:**

1. En un tubo Eppendorf® de 1.5 mL, disolver el p-nitrofenol en la cantidad de alcohol absoluto a ocupar.
2. Almacenar a -20°C.

### Ésteres de *p*-nitrofenilo [1 mM]

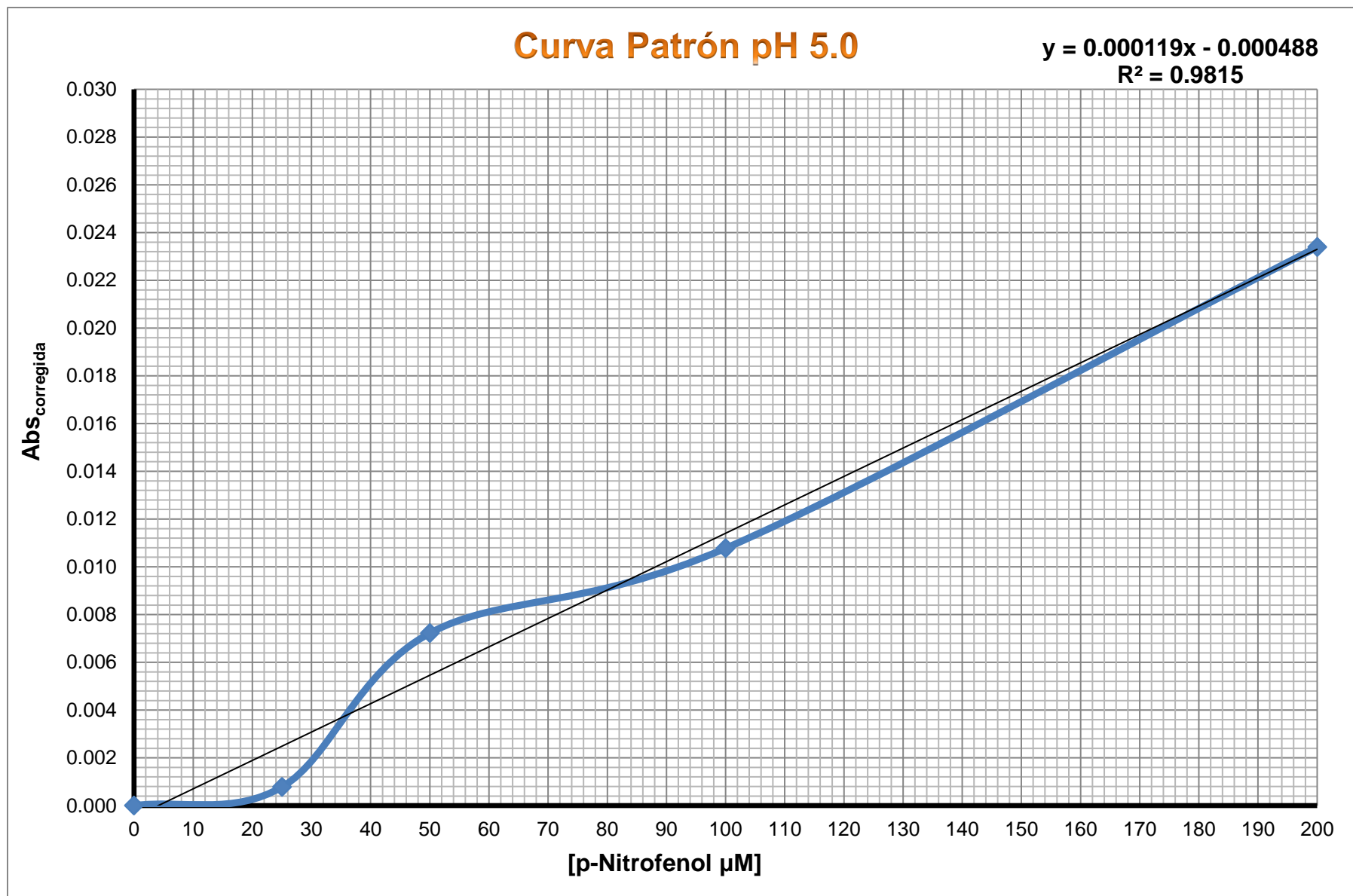
Sustancia	Cantidad para 1.0 mL
<i>p</i> -NF-Acetato (C2:0)	0.18 mg
<i>p</i> -NF-Butirato (C4:0)	0.21 mg
<i>p</i> -NF-Octanoato (C8:0)	0.26 mg
<i>p</i> -NF-Decanoato (C10:0)	0.29 mg
<i>p</i> -NF-Dodecanoato (C12:0)	0.32 mg
<i>p</i> -NF-Palmitato (C16:0)	0.38 mg
Alcohol Absoluto	1.0 mL

#### **Preparación:**

1. En un tubo Eppendorf® de 1.5 mL, disolver cada uno de los ésteres en el volumen de alcohol absoluto a ocupar.
2. Almacenar cada solución a -20°C.

**Nota:** Cada alícuota se debe de ocupar por un máximo de 7 días. Transcurrido este tiempo, es necesario volver a preparar la solución con el sustrato a ocupar.

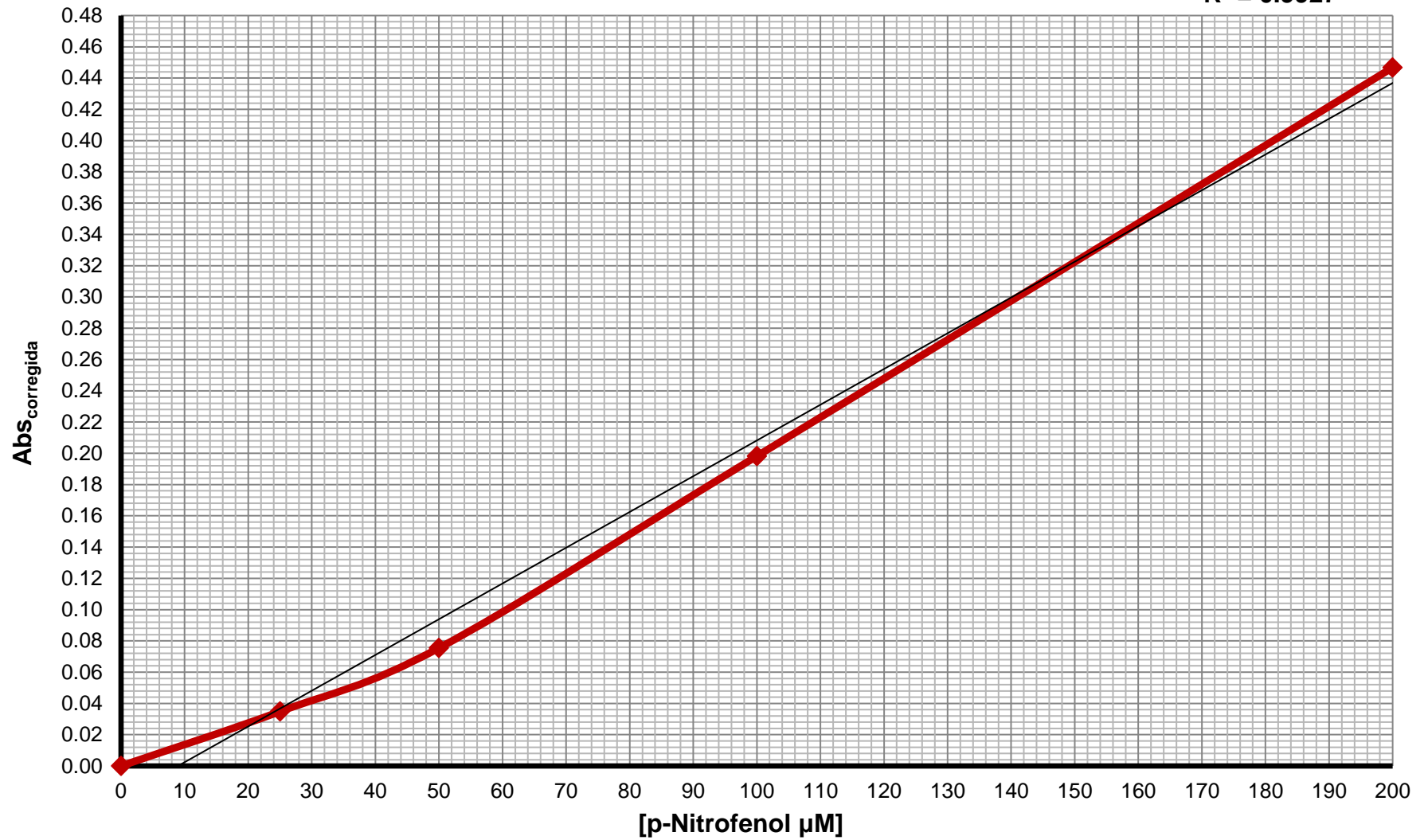
## 11.2. Curvas Patrón





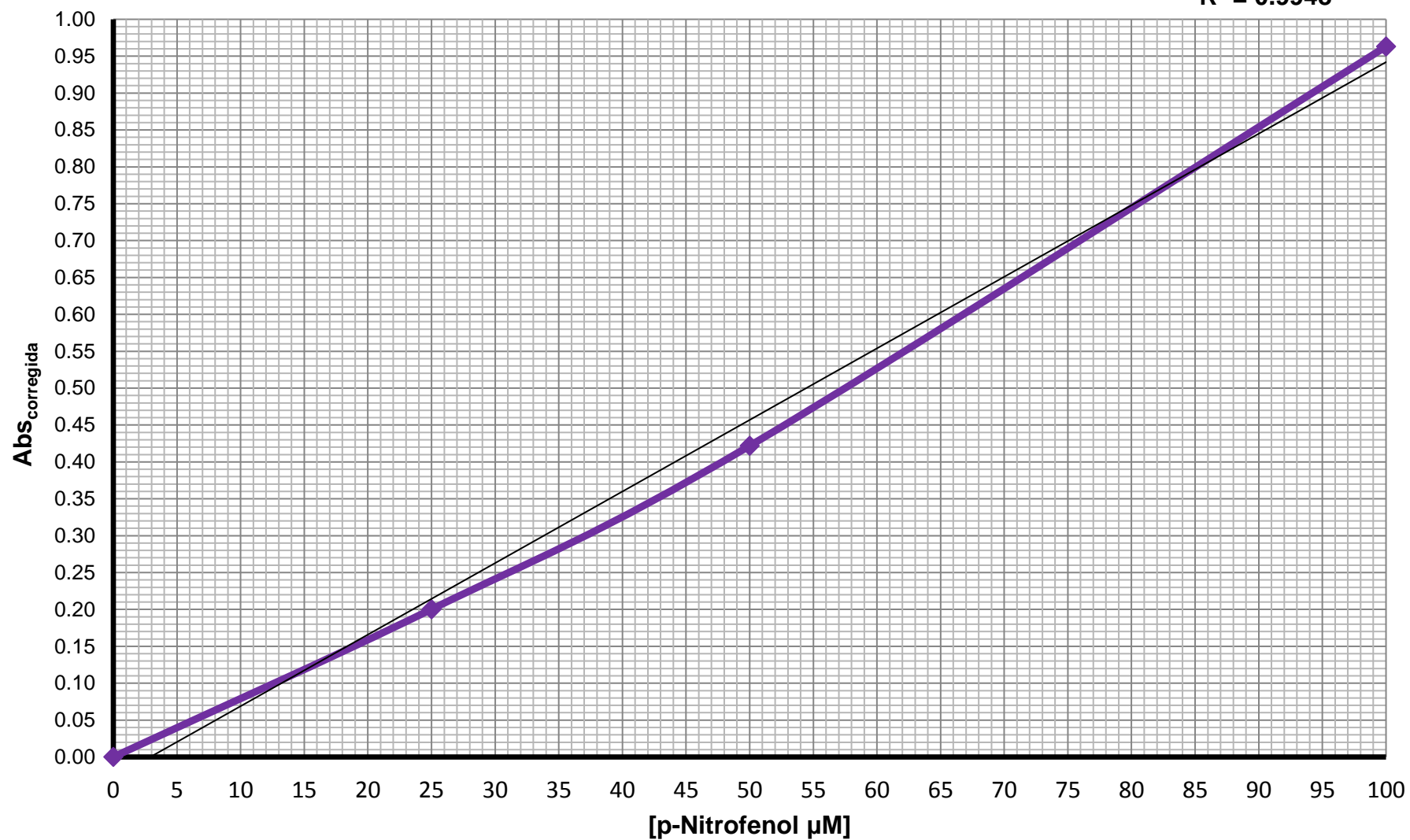
## Curva Patrón pH 6.0

$$y = 0.0023x - 0.0205$$
$$R^2 = 0.9927$$



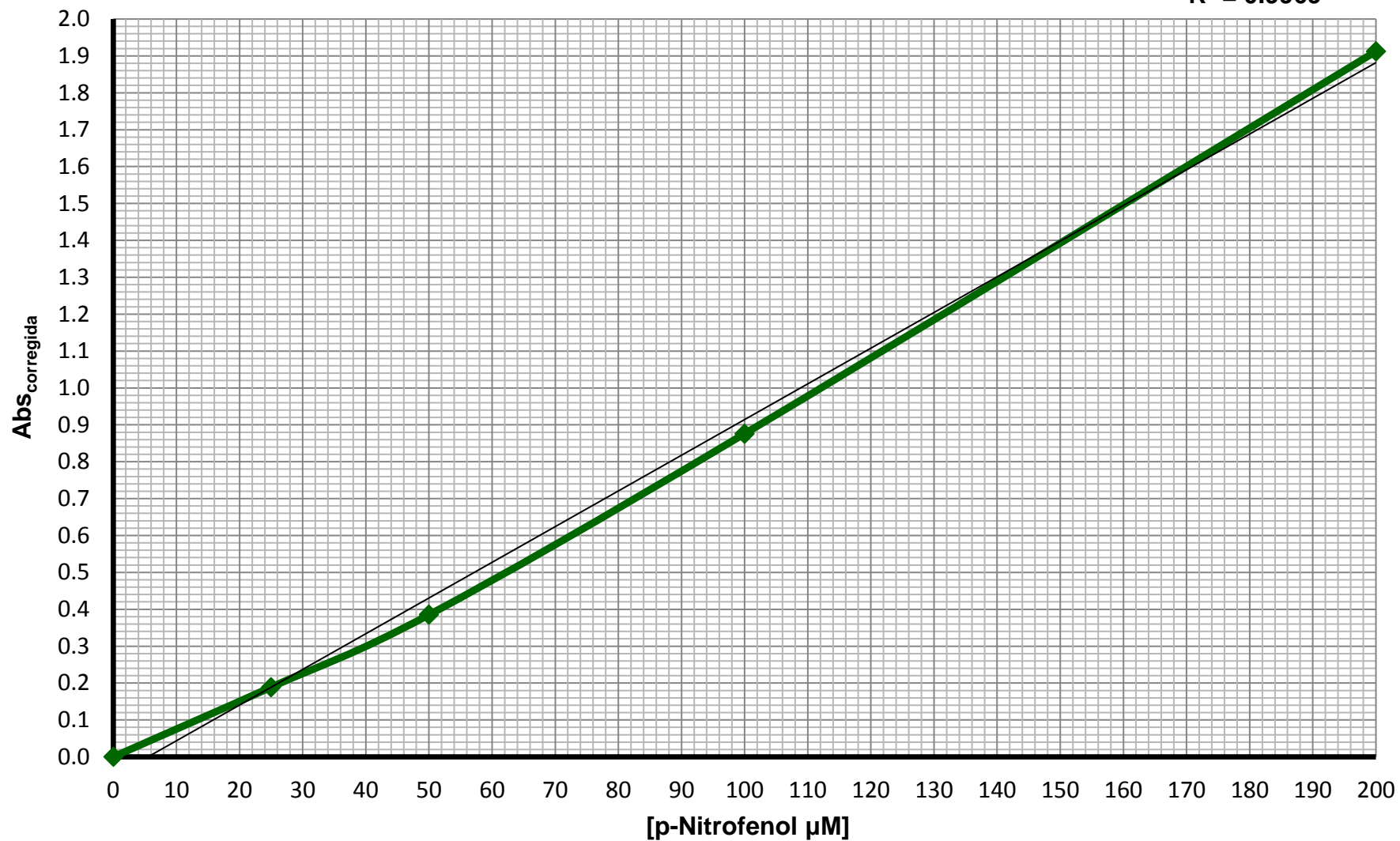
## Curva Patrón pH 7.0

$$y = 0.0097x - 0.0282$$
$$R^2 = 0.9948$$



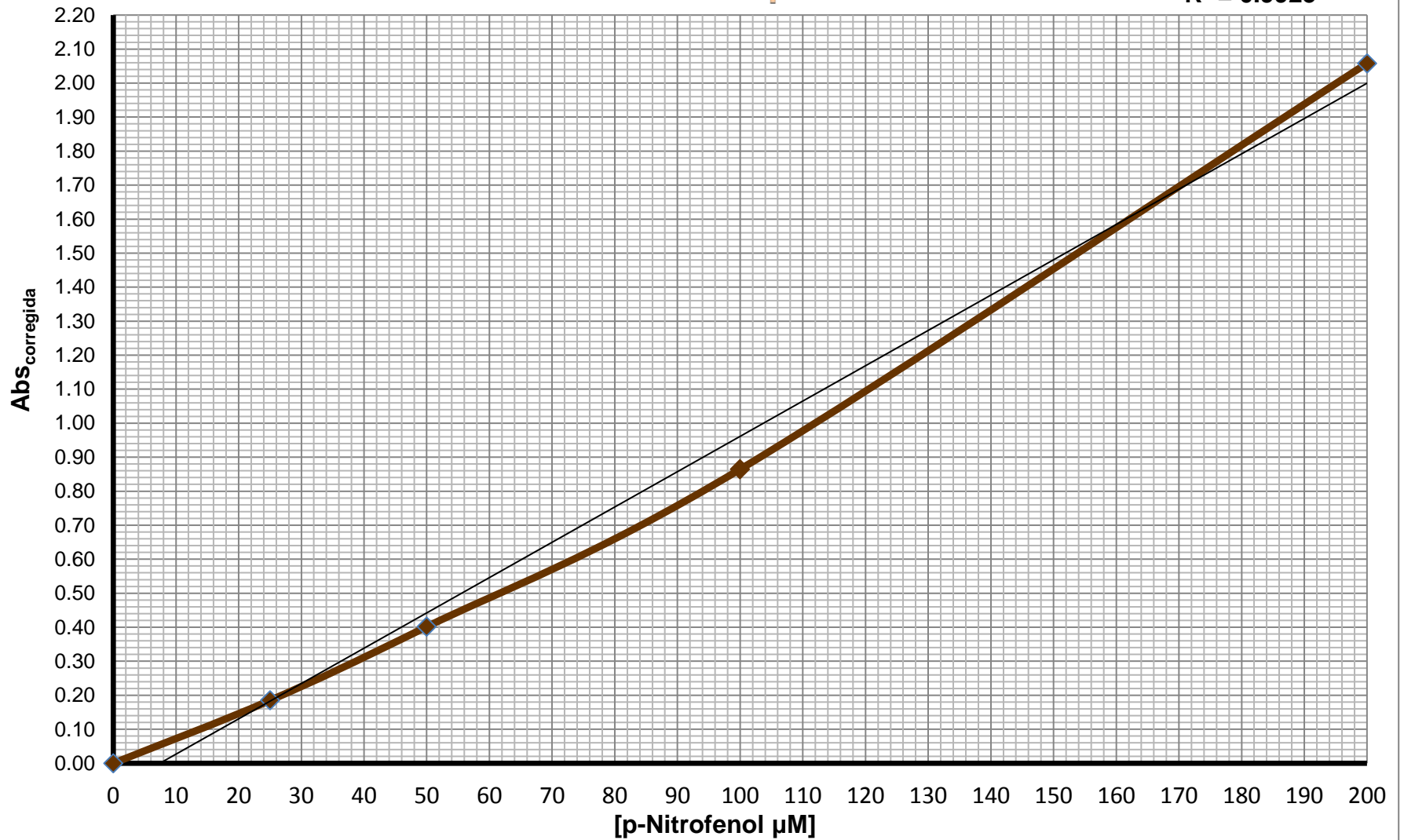
## Curva Patrón pH 8.0

$$y = 0.0097x - 0.0532$$
$$R^2 = 0.9969$$



## Curva Patrón pH 9.0

$$y = 0.0104x - 0.077$$
$$R^2 = 0.9925$$



### 11.3. Cálculo de la Actividad Específica.

1. Se procede a hacer la lectura espectrofotométrica del medio de reacción descrito en la sección de Metodología.
2. Se registran los valores obtenidos de cada ensayo.

Tiempo (min)		Valores obtenidos		
		1	2	3
0	Blanco	0,097	0,099	0,099
	9,3	0,389	0,362	0,403
	10,6	0,379	0,378	0,402

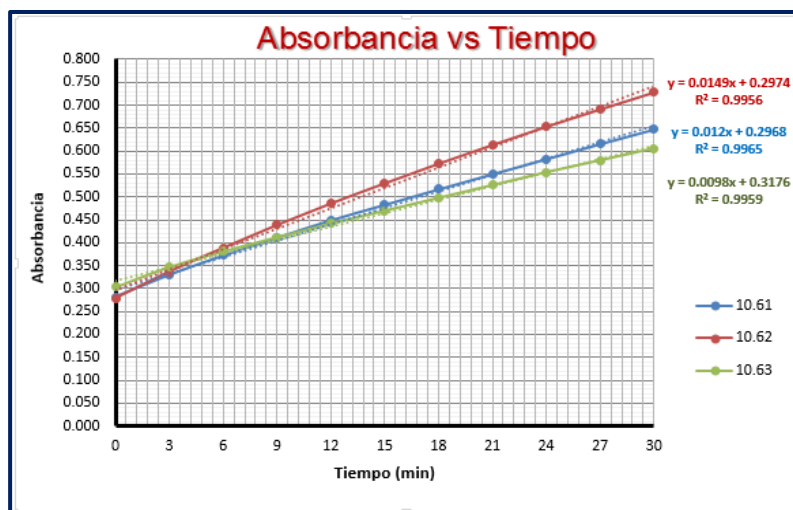
3. Para obtener el valor corregido de la Abs del medio de reacción, se resta el valor del blanco al valor del medio de reacción con la enzima añadida.

Valores corregidos			
	1	2	3
Blanco	0	0	0
9,3	0,292	0,263	0,304
10,6	0,282	0,279	0,303

4. Esta operación se hace para cada tiempo al cual se hizo la determinación.

Tiempo	9.3			10.6		
0	0.292	0.263	0.304	0.282	0.279	0.303
3	0.330	0.300	0.345	0.330	0.337	0.347
6	0.360	0.330	0.379	0.372	0.389	0.381
9	0.387	0.358	0.410	0.411	0.439	0.412
12	0.413	0.385	0.440	0.449	0.486	0.442
15	0.436	0.410	0.467	0.483	0.530	0.470
18	0.459	0.435	0.495	0.517	0.573	0.498
21	0.481	0.459	0.521	0.550	0.614	0.526
24	0.503	0.484	0.547	0.583	0.654	0.554
27	0.524	0.506	0.572	0.616	0.692	0.580
30	0.546	0.529	0.597	0.648	0.729	0.606

5. Se grafican todos los valores obtenidos, Abs vs Tiempo (min) y se calcula su coeficiente de correlación con su respectivo valor de la pendiente (m).



6. Para calcular la **Actividad Volumétrica (U/mL)**, se efectúa el cociente entre el valor de la pendiente experimental ( $m_{exp}$ ) con el valor de la pendiente de su respectiva curva patrón ( $m_{teórica}$ ). Posteriormente se realizan las conversiones correspondientes con el fin de que las unidades sean las correctas. Las curvas patrón a cada valor de pH se encuentra en la sección de Anexos 11.2

m experimental		m teórica (pH 7)	U/min	
9,3	10,6		9,3	10,6
0,0092	0,0149	0,0097	0,9485	1,5361
0,0087	0,012	0,0097	0,8969	1,2371
0,0082	0,0098	0,0097	0,8454	1,0103

$$\frac{U}{mL} = m_{exp} \left( \frac{Abs_{420\text{ nm}}}{\text{min}} \right) \left( \frac{V_{\text{final reacción}}}{V_{\text{inicial ext}}} \right) \left( \frac{1}{m_{teórica}} \right) \left( \frac{1}{\frac{Abs_{420\text{ nm}}}{\mu M \text{ pNF}}} \right)$$

8. Las unidades quedan de la siguiente manera:

$$\frac{U}{mL} = \left( \frac{Abs_{420\text{ nm}}}{\text{min}} \right) \left( \frac{\mu L}{\mu L} \right) = \frac{(Abs_{420\text{ nm}})(\mu M \text{ pNF})}{(\text{min})(Abs_{420\text{ nm}})}; \text{ se elimina el factor común}$$

$$\frac{U}{mL} = \frac{\mu M \text{ pNF}}{\text{min}} = \frac{\frac{\mu\text{mol pNF}}{L}}{\text{min}} = \frac{\mu\text{mol pNF}}{(\text{min})(L)}$$

$$\therefore \frac{U}{mL} = \frac{\mu\text{mol pNF}}{(\text{min})(L)}$$

9. El valor obtenido se divide entre la concentración de proteína obtenida previamente. Estos datos se encuentran en la sección de Resultados, en la Tabla 7.2

U/mL		[proteína mg/mL]	
9,3	10,6	G	J
0,00271	0,00439	9,482	4,229
0,00256	0,00353	9,482	4,229
0,00242	0,00289	9,482	4,229

$$\frac{U}{\text{mg proteína}} = \frac{\text{Actividad Específica}}{[\text{proteína}]}$$

$$\frac{U}{\text{mg}_{\text{proteína}}} = \frac{\frac{U}{\text{mL}}}{\frac{\text{mg}_{\text{proteína}}}{\text{mL}_{\text{extracto}}}} = \frac{(U)(\text{mL}_{\text{extracto}})}{(\text{mL})(\text{mg}_{\text{proteína}})}; \text{ se elimina el factor común}$$

$$\therefore \text{Actividad Específica} = \frac{U}{\text{mg}_{\text{proteína}}}$$

10. Este valor es la **Actividad Específica** de la enzima expresada en **U/mg proteína**. ☺

	U/mg proteína	
	G	J
	0,000286	0,001038
	0,000270	0,000836
	0,000255	0,000683
<b>PROMEDIO</b>	0,000270	0,000852
<b>D.E.</b>	0,000016	0,000178

#### 11.4. Análisis Estadístico

Para realizar el análisis estadístico de cada parámetro evaluado, se utilizó el programa *MiniTab Statistics 16*. Se realizaron anovas con un porcentaje de confiabilidad del 95% por el método de *Fisher*.

#### Especificidad por sustrato de los extractos intracelulares.

Los resultados del análisis estadístico de cada clona evaluada son los siguientes:

#### CLONA G

##### Tabla Anova

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	5	$3 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-7}$	38.74	0.000
Error	12	0.000	0.000		
Total	17	$3 \times 10^{-7}$			

##### Agrupación de datos por el método *Fisher*

Sustrato	N	Promedio	Agrupación		
<i>p</i> -nitrofenil-acetato	3	$2.70 \times 10^{-4}$	A		
<i>p</i> -nitrofenil-butilato	3	$3.40 \times 10^{-4}$	A		
<i>p</i> -nitrofenil-octanoato	3	$2.98 \times 10^{-4}$	A		
<i>p</i> -nitrofenil-decanoato	3	$1.07 \times 10^{-4}$		B	
<i>p</i> -nitrofenil-dodecanoato	3	$8.10 \times 10^{-5}$		B	
<i>p</i> -nitrofenil-palmitato	3	0.000			C

#### CLONA I

##### Tabla Anova

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	5	$2 \times 10^{-6}$	$4 \times 10^{-6}$	13.90	0.000
Error	12	$3 \times 10^{-7}$	0.000		
Total	17	$2.3 \times 10^{-6}$			

##### Agrupación de datos por el método *Fisher*

Sustrato	N	Promedio	Agrupación		
<i>p</i> -nitrofenil-acetato	3	$8.52 \times 10^{-4}$	A		
<i>p</i> -nitrofenil-butilato	3	$8.71 \times 10^{-4}$	A		
<i>p</i> -nitrofenil-octanoato	3	$9.43 \times 10^{-4}$	A		
<i>p</i> -nitrofenil-decanoato	3	$4.36 \times 10^{-4}$		B	
<i>p</i> -nitrofenil-dodecanoato	3	$5.00 \times 10^{-4}$		B	
<i>p</i> -nitrofenil-palmitato	3	0.000			C



## Efecto del pH sobre la actividad enzimática de los extractos intracelulares.

### CLONA G

Tabla Anova

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	$7 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-7}$	205.67	0.000
Error	10	0.000	$1 \times 10^{-7}$		
Total	14	$7 \times 10^{-7}$			

Agrupación de datos por el método Fisher

pH	N	Promedio	Agrupación			
5.0	3	0.000				D
6.0	3	$5.42 \times 10^{-4}$	A			
7.0	3	$1.65 \times 10^{-4}$			C	
8.0	3	$3.20 \times 10^{-4}$		B		
9.0	3	$5.70 \times 10^{-4}$	A			

### CLONA I

Tabla Anova

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	$2.1 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-7}$	1638.89	0.000
Error	10	0.000	0.000		
Total	14	$2.1 \times 10^{-6}$			

Agrupación de datos por el método de Fisher

pH	N	Promedio	Agrupación			
5.0	3	0.000				E
6.0	3	$2.55 \times 10^{-4}$			C	
7.0	3	$2.14 \times 10^{-4}$				D
8.0	3	$5.30 \times 10^{-4}$		B		
9.0	3	$1.08 \times 10^{-3}$	A			

**Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de los extractos intracelulares.**

**CLONA G**

**Tabla Anova**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	2	$1 \times 10^{-7}$	0.000	30.02	0.001
Error	6	0.000	0.000		
Total	8	$1 \times 10^{-7}$			

**Agrupación de datos por el método Fisher**

Temperatura	N	Promedio	Agrupación	
30.0	3	$3.93 \times 10^{-5}$		B
40.0	3	$3.10 \times 10^{-5}$		B
50.0	3	$2.26 \times 10^{-4}$	A	

**CLONA I**

**Tabla Anova**

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	2	0.000	0.000	17.95	0.003
Error	6	0.000	0.000		
Total	8	0.000			

**Agrupación de datos por el método Fisher**

Temperatura	N	Promedio	Agrupación	
30.0	3	$2.60 \times 10^{-5}$		C
40.0	3	$7.00 \times 10^{-5}$	B	
50.0	3	$1.14 \times 10^{-4}$	A	