



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

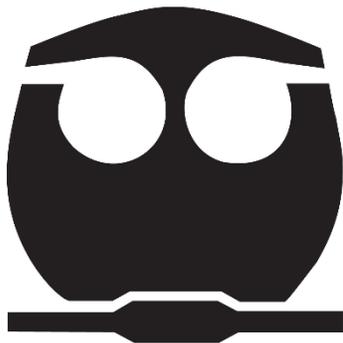
**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD
LIPOLÍTICA DE CLONAS DE UNA
BIBLIOTECA METAGENÓMICA
OBTENIDA DE QUESO COTIJA
ARTESANAL MADURADO.**

TESIS

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

PRESENTA

Carlos Miguel Díaz Vega



MÉXICO, D.F.

2016



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 ASIGANDO:

PRESIDENTE	Profesor: Arturo Navarro Ocaña.
VOCAL	Profesor: Sobeida Sánchez Nieto.
SECRETARIO	Profesor: Maricarmen Quirasco Baruch.
1er. SUPLENTE	Profesor: Carmina Montiel Pacheco.
2do. SUPLENTE	Profesor: Carolina Peña Montes.

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología del Edificio E de la facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch.

Los recursos para la realización de este trabajo provinieron del proyecto PAPIIT IN222115: "Análisis funcional del metagenoma bacteriano, inocuidad y potencial biotecnológico del género *Enterococcus* del queso Cotija", el cual también apoyo con recursos para becar al estudiante. Así mismo, se recibió apoyo económico del Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP-FQ) con clave 5000-9102.

Asesor del tema

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch.

Supervisor técnico

Dra. Carolina Peña Montes.

Sustentante

Carlos Miguel Díaz Vega.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Queso	3
2.1.1 Clasificación de queso	3
2.1.1.1 Definición de queso Cotija	4
2.1.1.2 Características fisicoquímicas del queso Cotija	5
2.1.1.3 Producción de queso Cotija	5
2.1.2 Maduración del queso	6
2.2 Enzimas	7
2.2.1 Hidrolasas	7
2.2.1.1 Triacilglicerol lipasas y sus generalidades	8
2.2.1.1.1 Aspectos estructurales de triacilglicerol lipasas	9
2.2.1.1.2 Carboxilesterasas y sus generalidades	10
2.2.1.2.1 Aspectos estructurales de carboxilesterasas	11
2.2.1.3 Mecanismo de hidrólisis de triacilglicerol lipasas y carboxilesterasas	11
2.2.2 Métodos de detección de microorganismos con actividad lipolítica	12
2.2.3 Aplicaciones industriales de triacilglicerol lipasas y carboxilesterasas	14
2.3 Metagenómica	15
2.3.1 Biblioteca metagenómica	16
2.3.1.1 Clasificación de bibliotecas metagenómicas	16
2.3.1.1.1 Vectores de clonación	17
2.3.1.1.2 Proceso de elaboración de bibliotecas metagenómicas	18
2.4 Antecedentes	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVO GENERAL	24
5.1 Objetivos particulares	24
6. METODOLOGÍA	25
6.1 Reactivación y conservación de las clonas	26
6.2 Verificación de actividad triacilglicerol lipasa y carboxilesterasa	26
6.3 Obtención de la fracción intracelular y extracelular	26
6.4 Cuantificación de proteína	27
6.5 Evaluación cualitativa de actividad enzimática esterasa de la fracción intracelular y extracelular	27
6.6 Determinación de peso molecular	28
6.6.1 Zimografía	29
6.7 Caracterización bioquímica de la enzima	29
6.7.1 Determinación de especificidad por sustratos	30
6.7.2 Determinación de pH óptimo	30
6.7.3 Determinación de temperatura óptima	30

7. RESULTADOS	31
7.1 Expresión enzimática	31
7.2 Identificación de actividad enzimática	32
7.3 Evaluación cualitativa de actividad enzimática carboxilesterasa de las fracciones intra y extracelulares	34
7.4 Determinación de peso molecular	36
7.5 Caracterización enzimática	38
7.5.1 Caracterización de la preparación enzimática cruda de la clona Est-A	38
7.5.1.1 Determinación de especificidad por sustratos	38
7.5.1.2 Determinación de pH óptimo	40
7.5.1.3 Determinación de temperatura óptima	41
7.5.2 Caracterización de la preparación enzimática cruda de la clona Est-C	43
7.5.2.1 Determinación de especificidad por sustratos	43
7.5.2.2 Determinación de pH óptimo	45
7.5.2.3 Determinación de temperatura óptima	46
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	47
9. CONCLUSIONES	51
10. PERSPECTIVAS	52
11. BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXOS	59
ANEXO I	60
ANEXO II	75
ANEXO III	77
ANEXO IV	83

1. INTRODUCCIÓN

El queso Cotija Región de Origen tiene una tradición de más de 400 años, con un origen dentro de la zona geográfica en la Sierra limítrofe entre Jalisco y Michoacán. Es un queso mexicano elaborado de manera artesanal con leche proveniente de ganado de doble propósito con un tiempo mínimo de 3 meses de maduración. Es de pasta presentada, no cocida, de textura firme, friable, con olor característico y de forma cilíndrica (Álvarez *et. al.*, 2005; NMX-F-735-COFOCALEC-2011).

Dentro del grupo de trabajo, se ha estudiado la microbiota del queso Cotija, y se han identificado algunos microorganismos con actividad lipolítica, así como su fuente y forma de inoculación a lo largo del proceso de manufactura del queso (ordeña, cuajado, salado manual, en materia prima (leche y sal de mar en grano)). Se ha determinado que en la matriz alimenticia existen las condiciones favorables para el desarrollo de microorganismos así como para su actividad enzimática. Una de las estrategias realizadas recientemente en el grupo de trabajo para buscar nuevas enzimas con actividad esterasa dentro de la microbiota del queso, fue la clonación de una colección de fragmentos de ADN, que de forma representativa contienen todos los genomas microbianos, la cual es denominada biblioteca metagenómica (Escobar, 2012; García, 2011; Robles, 2014; Torres, 2016).

En el presente trabajo se estudiaron algunas de las clonas aisladas de la biblioteca metagenómica de expresión de queso Cotija, que fueron seleccionadas por su capacidad de hidrolizar acetato de α -naftilo y tributirina, a las cuales se le realizó su reactivación, conservación y verificación de actividad esterasa. Se realizaron pruebas cualitativas de las fracciones intracelulares y extracelulares de cada clona identificada con actividad de esterasa, mediante la utilización de acetato de α -naftilo como sustrato. Se seleccionaron dos clonas, Est-A y Est-C, por su mayor actividad enzimática en la fracción intracelular. En ensayos de electroforesis y zimografía cada clona seleccionada presentó actividad en 4 bandas de proteínas, con pesos de 44.9 KDa, 37.1 KDa, 35.0 KDa y 27.8 KDa para la clona Est-A y de 44.7 KDa, 38.0 KDa, 35.8 KDa y 28.4 KDa para la clona Est-C.

Cada fracción intracelular de las clonas seleccionadas, se le evaluó bioquímicamente la actividad enzimática, en términos de especificidad por sustratos (con ésteres de *p*-nitrofenilo (C₂ - C₁₆) como sustratos), pH óptimo (pH 6 - pH 9) y temperatura óptima (25°C, 30°C, 40°C y 50°C). Teniendo una actividad específica de $3.26 \times 10^{-3} \pm 1.55 \times 10^{-4}$ U/mg de proteína para Est-A y $2.56 \times 10^{-3} \pm 1.34 \times 10^{-4}$ U/mg de proteína para Est-C en condiciones óptimas (butirato de *p*-nitrofenilo, pH 9 y 40°C) para ambos casos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 QUESO

El queso es el resultado de la concentración selectiva de la leche, obtenida a través de su coagulación (precipitación de las caseínas y obteniendo como residuo el suero de leche) a través de dos métodos: por vía enzimática (renina), o bien, por acidificación (cercano al punto isoelectrico de las caseínas, pH 4.6).

El agua se elimina en distintas proporciones, de acuerdo a cada variedad de queso, arrastrando con ella una parte de elementos solubles y de proteínas de leche no coaguladas (lactosuero). El agua que queda retenida en el queso, es esencial para el desarrollo de los microorganismos, determina la velocidad de las fermentaciones y de la maduración, así como el tiempo de conservación, textura del queso y rendimiento del proceso de elaboración (Walstra y Oria, 1991; Badui, 2013).

2.1.1 CLASIFICACIÓN DE QUESO

En todo el mundo existen más de 2000 tipos de quesos, los cuales se clasifican de acuerdo a diversos criterios, tales como (Belitz y Grosch, 1997; Hernández, 2007; NMX-F-735-COFOCALEC-2011):

- **Tipo de leche:** Ya sea de vaca, cabra, oveja o cualquier otro mamífero.
- **Tipo de cuajado:** Acidificación, enzimático (renina) o combinación de ambos.
- **Al contenido de agua de la materia seca magra (%):** Queso muy duros (<47), queso duro (<56), queso para lonchas (54-63), quesos semigrasos para lonchas (61-69), quesos blandos (67-76), queso fresco (73-87).
- **Al contenido de grasa de la materia seca (%):** Queso doble crema (60-85), queso crema (≥ 50), queso graso (≥ 40), quesos supergrasos (≥ 45), Quesos semigrasos (≥ 20), queso magro (<10).
- **Tipo de maduración:** Bacterias, mohos o combinación de ambos.

2.1.1.2 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL QUESO COTIJA

El queso Cotija artesanal madurado (**Figura 2**) debe cumplir con un mínimo del 25 % BH (m/m) de proteínas propias de la leche, tales como caseínas α -CN, β -CN, κ -CN y proteínas del suero residuales (β -LG principalmente). Un mínimo de 23 % BH (m/m) de grasa butírica (triacilglicéridos, colesterol, fosfolípidos, ácidos grasos libres, 1,2-diacilglicéridos) y un máximo del 36 % BH (m/m) de humedad.

Como únicos ingredientes permitidos para su elaboración está la adición de cloruro de sodio (sal de mar en grano procedente del estado de Colima) y cuajo de origen animal (Belitz y Grosch, 1997; NMX-F-735-COFOCALEC-2011).

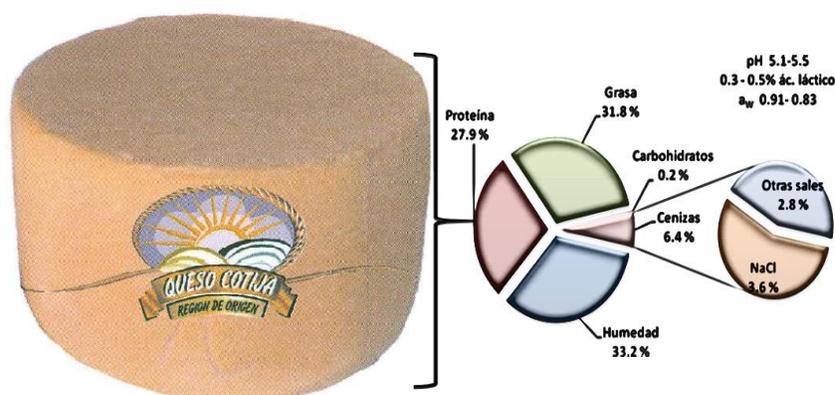


Figura 2. Queso Cotija Región de Origen.

2.1.1.3 PRODUCCIÓN DE QUESO COTIJA

El queso Cotija Región de Origen sólo se elabora en temporada de lluvia (junio a noviembre). Se parte de leche obtenida de un solo ordeño. El ganado que se utiliza es de doble propósito, raza cebú, Suiza o mezcla de éstas. La leche obtenida se mezcla y se deja reposar de 3 a 4 h a temperatura ambiente, en este proceso la leche alcanza una temperatura de $\sim 34^{\circ}\text{C}$, un pH cercano a 7 y la microbiota natural incrementa. Posteriormente se procede a la coagulación enzimática de la leche, mediante la utilización de cuajo (renina) de origen animal; el tiempo de cuajado depende de cada productor y va de 30 min a aproximadamente 1 h.

Una vez alcanzada la consistencia deseada del coágulo, éste se fragmenta en pequeñas proporciones (equivalentes a un grano de maíz, $\sim 1 \text{ cm}^3$) con utensilios apropiados y limpios con el fin de aumentar la superficie de desuerado. La parte sólida (cuajada) se separa del suero y es drenada por compresión con ayuda de una manta de algodón limpia.

La cuajada drenada se desmorona manualmente en su totalidad y posteriormente se le adiciona sal de mar en grano procedente del estado de Colima ($\sim 138\text{-}140 \text{ g}$ por cada 20 L de leche), adquiriendo una textura granulosa, este proceso ayuda a regular el desarrollo microbiano, evitando bacterias indeseables, controla agentes de maduración y mejora propiedades organolépticas.

La masa salada se introduce en un aro de diámetro específico, el cual está cubierto en su interior con dos bandas *ixtle* (fibra de maguey) que envolverán la masa. El aro y las fibras en conjunto, confieren la forma y volumen del queso, así como el dibujo característico de la corteza; proporcionando una presentación cilíndrica de $\sim 20 \text{ kg}$. Una vez fajada la pasta se prensa utilizando piedras de entre 50 y 80 Kg por un periodo de 18 a 24 h . Durante este periodo se voltea el queso continuamente sobre su propia cara. Pasado este tiempo, la pasta prensada se mantiene fajada durante 15 días o hasta que alcance la firmeza deseada a temperatura ambiente, para que cada pieza pueda ser manipulada.

Posteriormente se procede a desfajar el queso, volteándolo cada tercer o cuarto día (alternando la cara expuesta al medio). La superficie del queso se limpia con un trapo limpio, suave y que no desprenda materia extraña (hilos, etc.) que pueda poner en riesgo la calidad del queso. Dichas acciones se realizan durante los primeros tres meses (inicio del proceso de maduración) dentro de la zona geográfica (Figura 1) (Álvarez *et. al.*, 2005; García, 2011; Hernández, 2007; NMX-F-735-COFOCALEC-2011).

2.1.2 MADURACIÓN DEL QUESO

Durante el proceso de maduración, los microorganismos provenientes de cultivos iniciadores y/o de la microbiota secundaria (microorganismos que actúan después de la etapa de cuajado, adicionados o no intencionalmente, como bacterias ácido lácticas no iniciadoras, levaduras, hongos y mezclas complejas de bacterias) desempeñan un papel importante en cada tipo de

queso. En el caso del queso Cotija al no adicionarse un cultivo iniciador, la microbiota secundaria desempeña un papel importante en la formación de compuestos involucrados en el desarrollo del aroma, sabor y textura, los cuales son derivados de las principales rutas metabólicas como la glicólisis, lipólisis, proteólisis y metabolismo del citrato, seguidas por reacciones secundarias sobre los compuestos producidos en estas primeras reacciones, por ejemplo: desaminación, descarboxilación y β -oxidación de ácidos grasos (Alcántara, 2009; García, 2011).

2.2 ENZIMAS

Las enzimas son proteínas con actividad catalítica. Las enzimas de origen microbiano son a menudo más utilizadas que las enzimas provenientes de plantas o animales, debido a que tienen una gran variedad de actividades catalíticas, altos rendimientos, facilidad en la manipulación genética, ya que los microorganismos presentan un crecimiento rápido en medios de cultivo de bajo costo donde se producen las enzimas (Wiseman, 1995).

En este trabajo son de interés el grupo de las lipasas, la capacidad de las lipasas para catalizar la hidrólisis y la síntesis de ésteres ha sido reconocida desde hace 70 años (Van Der Walle, 1927).

2.2.1 HIDROLASAS

Las enzimas hidrolíticas (EC 3), las cuales catalizan la ruptura de un enlace por la adición de una molécula de agua, se clasifican en diferentes grupos dependiendo del grupo que hidrolizan.

Las enzimas que actúan sobre enlaces éster (EC 3.1) a su vez tienen una sub-clasificación, en las cuales se encuentran las que hidrolizan ésteres carboxílicos (EC 3.1.1), dentro de éstas, se encuentran las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) y las triacilglicerol lipasas (EC 3.1.1.3) (IUBMB, 2015).

2.2.1.1 TRIACILGLICEROL LIPASAS Y SUS GENERALIDADES

Las triacilglicerol lipasas (EC 3.1.1.3) se encuentran dentro de las enzimas más atractivas para la síntesis de reacciones orgánicas debido a que muestran una alta quimio-, regio-, y enantioselectividad, presentan una alta estabilidad en disolventes orgánicos y usualmente no requieren de cofactores (Jaeger y Eggert, 2002).

Estas enzimas catalizan la hidrólisis de ésteres preferencialmente insolubles en agua, es decir, ésteres con ácidos grasos de cadena larga ($\geq C_{10}$), **Figura 3** (Bornscheuer, 2002; Sriyapai *et. al.*, 2015).

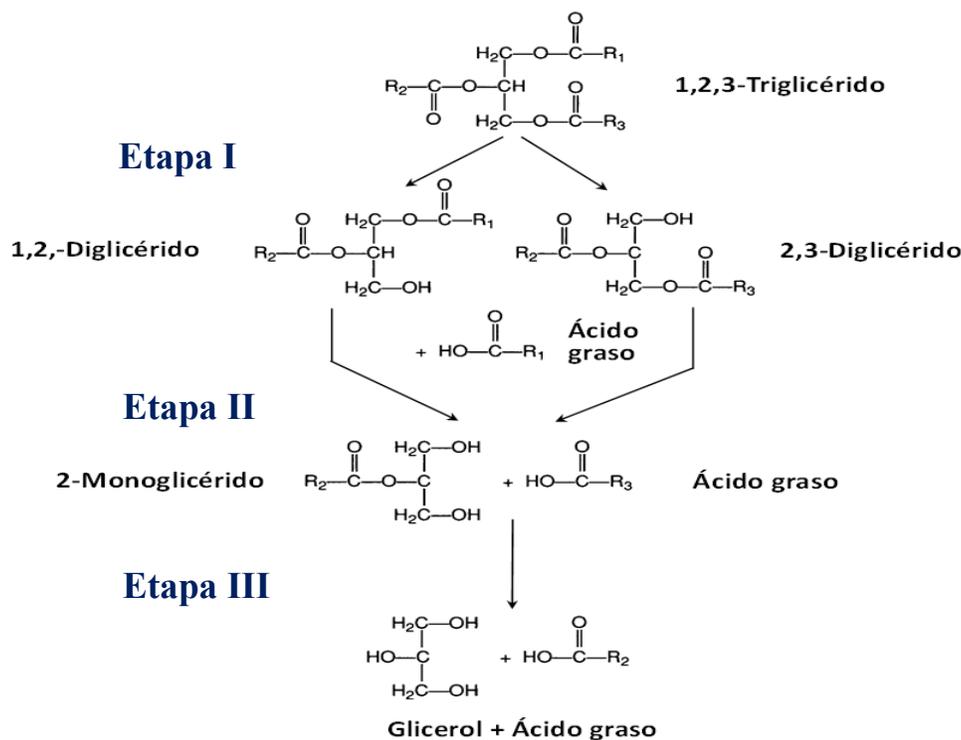


Figura 3. Etapas de reacción de hidrólisis de triacilglicéridos (Imagen de Quirasco y Lopez, 2013). *Como ejemplo:* Si R₁, R₂, R₃ representan ácidos grasos con $\geq C_{10}$. Cuando se completa la etapa III se trata de una hidrólisis total y una hidrólisis parcial es cuando se completa la etapa I o II.

Presentan una gran versatilidad de reacción, debido a que son capaces de realizar además de la hidrólisis, distintas reacciones de síntesis, las cuales se pueden clasificar en dos tipos: En reacciones de esterificación como esterificación, amidación y tioesterificación, y el otro tipo incluye la transesterificación como la reacción de aminólisis, alcoholisis, acidólisis e interesterificación **Figura 4**.

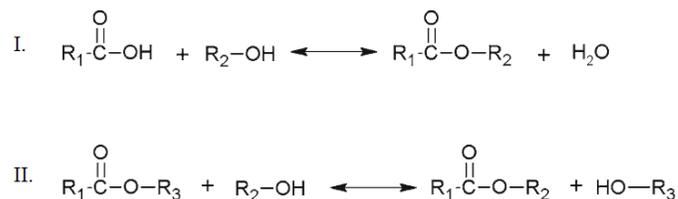


Figura 4. Reacción catalizada por las triacilglicerol lipasas. I. Reacción de esterificación y II. Reacción de alcoholisis.

2.2.1.1.1 ASPECTOS ESTRUCTURALES DE TRIACILGLICEROL LIPASAS

Las triacilglicerol lipasas presentan un plegamiento α/β hidrolasa, el cual también es encontrado en enzimas como proteasas y haloperoxidasas (**Figura 5**), su actividad se basa en una triada catalítica de Serina (Ser) - Ácido aspártico (Asp) – Histidina (His), Ácido glutámico (Glu) en vez de Asp para algunas triacilglicerol lipasas, y por lo general tiene un pentapéptido altamente conservado formado por una secuencia de Gly-x-Ser-x-Gly (donde x puede ser cualquier aminoácido) el cual es encontrado alrededor del sitio activo de la serina (Bornscheuer, 2002; Ollis *et. al.*, 1992; Wei *et. al.*, 1995).

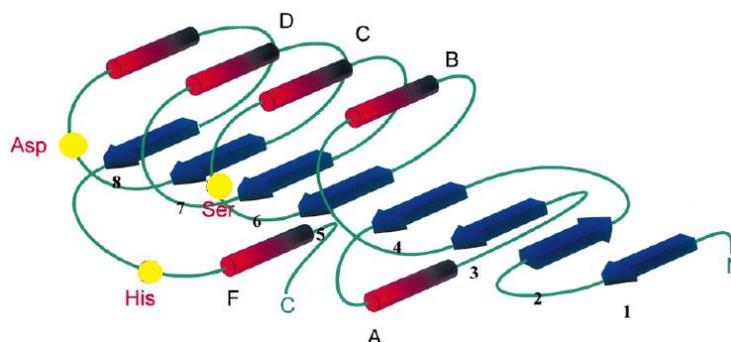


Figura 5. Diagrama del plegamiento α/β hidrolasa. Hojas β (1-8) representadas con flechas azules y las hélices α (A-F) representadas con cilindros rojos. Residuos que componen la triada catalítica: nucleófilo (serina), ácido (aspartato), histidina; están representados de círculos amarillos. Extremo amino (N) y extremo carboxilo-terminal (C). Tomada y modificada de Bornscheuer, 2002.

La mayoría de estas enzimas presentan el fenómeno de activación interfacial, el cual se debe a la presencia de un dominio hidrofóbico “tapa”, que cubre el sitio activo de las triacilglicerol lipasas. Dicha activación ocurre en la interfase agua-aceite, debido a que el sitio activo debe estar expuesto hacia la región hidrofóbica pero con acceso a la fase acuosa, ya que necesita la participación de moléculas de agua en la catálisis, y sólo con la presencia de un mínimo de concentración del sustrato la tapa se aparta, dejando el sitio activo libre. Excepciones de activación interfacial se presentan en las triacilglicerol lipasas provenientes de *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida antarctica B*, a pesar de que todas estas enzimas contienen una pequeña “tapa” (Bornscheuer, 2002; Bornscheuer *et. al.*, 2002; Quirasco y Lopez, 2013; Reetz, 2002; Schmid y Verger, 1998; Verger, 1997).

2.2.1.2 CARBOXILESTERASAS Y SUS GENERALIDADES

Las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) son otro tipo de enzimas, capaces de hidrolizar enlaces tipo éster carboxílicos formados por ácidos grasos de cadena corta ($\leq C_8$) parcialmente solubles en agua (Figura 6); presentan una ligera estabilidad y actividad frente a disolventes orgánicos. Por lo cual, la diferencia entre estas enzimas y las lipasas “verdaderas” o triacilglicerol lipasas, se basa en la longitud de la cadena de los ácidos carboxílicos que utilizan como sustrato.

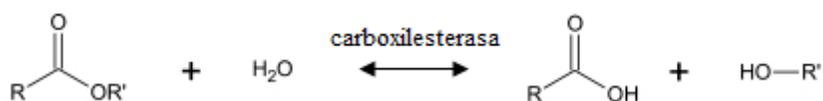


Figura 6. Reacción catalizada por carboxilesterasas.

La cinética de hidrólisis de las carboxilesterasas es representada por la cinética tradicional de Michaelis-Menten, mientras que la cinética de hidrólisis para las triacilglicerol lipasas no puede ser descrita por dicho modelo, debido al fenómeno de activación interfacial (Bornscheuer, 2002; Fojan *et. al.*, 2000; Sriyapai *et. al.*, 2015; Torres, 2016).

2.2.1.2.1 ASPECTOS ESTRUCTURALES DE CARBOXILESTERASAS

Las carboxilesterasas presentan un plegamiento α/β hidrolasa, su actividad se basa en una triada catalítica de Ser-Asp-His (Figura 5), al igual que las triacilglicerol lipasas antes descritas, aunque éstas difieren de dichas enzimas (Tabla 1), debido a que carecen del dominio hidrofóbico “tapa” alrededor del sitio activo. Recientemente, se ha identificado que contienen un motivo consenso formado por Gly-x-x-Leu (Bornscheuer, 2002; Ollis *et. al.*, 1992; Wei *et. al.*, 1995).

Tabla 1. Diferencias entre triacilglicerol lipasas y carboxilesterasas. Tomada y modificada de Bornscheuer, 2002.

Propiedad	Triacilglicerol lipasas	Carboxilesterasas
Sustrato preferencial	Triglicéridos de cadena larga ($\geq C_{10}$)	Triglicéridos de cadena corta ($\leq C_8$)
	Ésteres de alcoholes secundarios	Ésteres simples
Activación interfacial (tapa)	Si	No
Hidrofobicidad del sustrato	Alta	Alta a baja
Estabilidad a disolventes orgánicos	Alta	Alta a baja

2.2.1.3 MECANISMO DE HIDRÓLISIS DE TRIACILGLICEROL LIPASAS Y CARBOXILESTERASAS

El mecanismo de formación o hidrólisis del enlace éster es esencialmente el mismo tanto para las lipasas y carboxilesterasas, el cual consta de cuatro pasos (Figura 7):

- I. El sustrato es ligado al sitio activo de serina.
- II. Se forma un intermediario tetraédrico, el cual es estabilizado por los residuos catalíticos de His y Asp o Glu del sitio catalítico.
- III. El alcohol es liberado y se forma el complejo acil-enzima.
- IV. Ataque de un nucleófilo (agua en hidrólisis, alcohol o éster en (trans-)esterificación) nuevamente forma el intermediario tetraédrico, teniendo como resultado el producto (un ácido o un éster) y la liberación de la enzima (Bornscheuer y Kazlauskas, 1999).

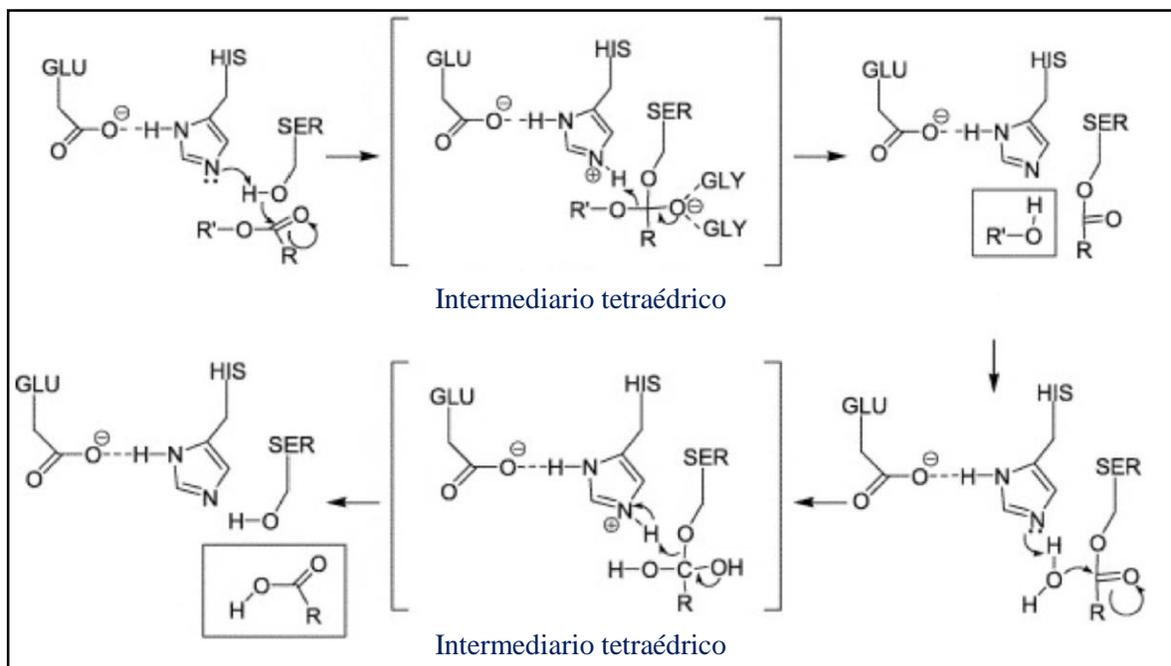


Figura 7. Mecanismo de hidrólisis de triacilglicerol lipasas y carboxilesterasas.

2.2.2 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

Para la identificación de actividad lipolítica *in situ* de microorganismos, se utilizan medios de cultivo sólidos complementados con sustratos (Figura 8(a)), como tributirina (C₄), tricaprilina (C₈) (actúan como sustratos de carboxilesterasas, ya que contiene ácidos grasos de cadena corta) y aceite de olivo, estearina (C₁₈), trioleína (C_{18:1}) (actúan como sustratos de triacilglicerol lipasas, ya que contienen ácidos grasos de cadena larga). Como tales sustratos son insolubles se tiene que hacer una emulsión, por lo que los medios de cultivo son opacos. Una actividad enzimática positiva se observa mediante la formación de halos de aclaramiento alrededor de las colonias (Bornscheuer, 2002; Ferrer *et.al.*, 2005; Lescic *et.al.*, 2010).

También se han empleado métodos fluorogénicos en la detección de actividad lipolítica *in situ* en biopelículas, mediante la implementación de escaneo por microscopio confocal laser de barrido (CLSM), utilizando como sustrato ELF-97 palmitato (Tielen *et. al.*, 2013).

Para discernir entre triacilglicerol lipasas y carboxilesterasas, usualmente, se emplean métodos espectrofotométricos mediante el uso de sustratos como ésteres de α/β naftol ($C_2 - C_{12}$) con Fast Blue RR o Fast Red TR (Figura 8(b)), ésteres de *p*-nitrofenilo ($C_2 - C_{18}$) (Figura 8(c)). También se han empleado métodos analíticos volumétricos (valoraciones) utilizando como sustratos ésteres de polioxietileno de sorbitan (Tween 20, 40, 60, 80) (Figura 8(a)) (Bornscheuer, 2002; Lescic *et.al.*, 2001; Lescic *et.al.*, 2010; Miller y Karn, 1980; Peña, 1998; Peña, 2001).

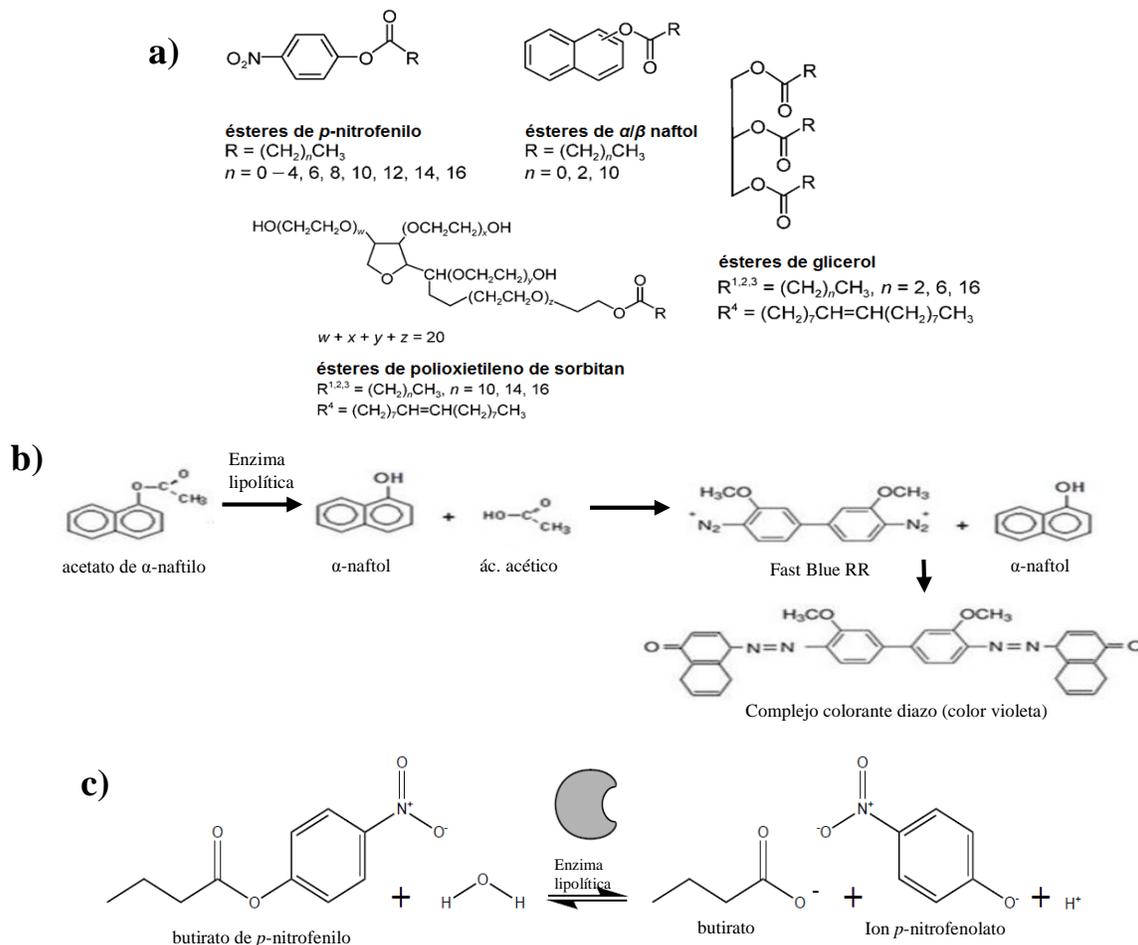


Figura 8. (a) Estructura química de algunos de los sustratos utilizados para la detección de actividad lipolítica, (b) Reacción de hidrólisis de acetato de α -naftilo con Fast Blue RR, (c) Reacción de hidrólisis del butirato de *p*-nitrofenilo. Tomada y modificada de Lescic *et.al.*, 2010; Torres, 2016.

2.2.3 APLICACIONES INDUSTRIALES DE TRIACILGLICEROL LIPASAS Y CARBOXILESTERASAS

Tanto las carboxilesterasas como las triacilglicerol lipasas componen uno de los grupos más importantes de biocatalizadores utilizados en diferentes sectores industriales y de aplicación biotecnológica (Aurilia *et. al.*, 2008; Jaeger y Eggert, 2002), como:

- **Industria de detergentes:** Las lipasas son utilizadas en formulaciones de detergentes en conjunto con otras enzimas (amilasas y proteasas), su función es remover manchas de grasa derivadas de frituras, mantequilla, de ciertos cosméticos, salsas a base de grasas, etc., mediante la hidrólisis de los triglicéridos a sus respectivos ácidos grasos, haciendo de éstos más solubles y removibles de las superficies (Hasan *et. al.*, 2006).
- **Industria alimenticia:** Se utilizan enzimas lipolíticas para la producción de ésteres, los cuales forman compuestos volátiles que contribuyen al sabor y aroma. También se han empleado triacilglicerol lipasas en la generación de lípidos estructurados, cuya composición de ácidos grasos, ha sido determinada para mejorar o disminuir la biodisponibilidad de uno o en los tres ácidos grasos que lo componen; p.j. el triacilglicérido OPO (oléico(C_{18:1})-palmítico(C₁₆)-oléico(C_{18:1})) obtenido por interesterificación de tripalmitina con ácido oléico. Otro ejemplo, es la elaboración de sustituto de manteca de cacao a partir de aceite de palma y ácido esteárico (Hasan *et. al.*, 2006; Peña y Quirasco, 2014).
- **Industria agroquímica:** Las triacilglicerol lipasas se utilizan en la producción de agroquímicos como el compuesto enantiopuro (*S*)-indanofano, el cual es un herbicida utilizado contra malezas en campos de cosecha con cultivos de arroz (Jaeger y Eggert, 2002).
- **Cosméticos:** Se han empleado lipasas inmovilizadas como catalizadores para generar compuestos como miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo y 1-etilhexil palmitato, que son utilizados como emolientes en productos de uso personal, como: crema corporal, aceites de baño, cremas de bronceado, etc (Hasan *et. al.*, 2006).
- **Producción de precursores de polímeros biodegradables:** Las lipasas se han usado muy comúnmente en síntesis orgánicas, para la producción de compuestos biodegradables como 1-butil oleato por reacción de esterificación (el cual es utilizado

para disminuir la viscosidad del biodiesel) y de ésteres de trimetilolpropano (implementados como lubricantes) (Hasan *et. al.*, 2006; Linko *et. al.*, 1998). También las triacilglicerol lipasas y carboxilesterasas son utilizadas como catalizadores en la síntesis de compuestos poliméricos biodegradables como polifenoles y poliésteres (Jaeger y Egger, 2002).

La producción de enzimas de fuentes naturales para la aplicación industrial presentan problemas relacionados a bajos rendimientos y altos costos, debido a su escases de fuentes y/o dificultad de aislamiento (Demain y Vaishnav, 2009; Salazar *et. al.*, 2013). La ingeniería genética y la tecnología del ADN recombinante han dado una alternativa para la producción de enzimas recombinantes en cantidades suficientes, producidas en hospederos seleccionados como microorganismos y plantas transgénicas, las cuales han abatido los costos de producción. El mercado global de la industria enzimática alcanzó un valor de \$4.4 billones de dólares en el 2015, aproximadamente el 90 % de las enzimas utilizadas a nivel industrial son enzimas recombinantes (Adrio y Demain, 2014) y en algunos casos, las enzimas recombinantes extracelulares son baratas (\$10-20 dólares por kg de proteína) (Beilen y Li, 2002).

2.3 METAGENÓMICA

El metagenoma es una colección de genomas de todos los microorganismos presentes en un determinado hábitat (Handelsman *et. al.*, 1998). El metagenoma ha permitido tener un incremento en el número de secuencias de ADN provenientes de microorganismos no cultivables, dichas secuencias son actualmente explotadas para aplicaciones farmacéuticas y biotecnológicas; así como para incrementar el conocimiento del nicho microbiológico y requerimientos de dichos microorganismos (Hasan *et. al.*, 2006; Streit y Schmitz, 2004).

Por lo cual, la metagenómica es el análisis genómico de comunidades microbianas tanto cultivables como no cultivables. El término deriva del concepto *meta*-análisis, el proceso de combinar análisis separados estadísticamente, y genómica, el análisis exhaustivo del material genético de organismos (Rondon *et. al.*, 2000; Schloss y Handelsman, 2003).

Las bibliotecas metagenómicas han sido utilizadas para aislar nuevos genes de grandes bancos genéticos de microorganismos no cultivables y/o de microorganismos difíciles de cultivar (Hasan *et. al.*, 2006; Handelsman *et. al.*, 1998; Lorenz *et. al.*, 2002; Rondon *et. al.*, 2000).

2.3.1 BIBLIOTECA METAGENÓMICA

Una biblioteca metagenómica es una colección de fragmentos de ADN clonados en un vector, que de forma representativa contienen todos los genomas de una comunidad microbiana presentes en un determinado hábitat como aceites, suelos, estanques de agua, hielo glaciar, rumen de vaca, queso Mozzarella (MBC), etc (Devirgiliis *et. al.*, 2014; Handelsman, 2004; Steele *et. al.*, 2009; Torres, 2016).

El escrutinio de una biblioteca metagenómica se puede realizar mediante un análisis funcional, en el caso de bibliotecas de expresión, o por un análisis de secuencias (Figura 9). El análisis funcional, inicia con la identificación de las clonas que expresan el fenotipo deseado, seguida de la caracterización de las clonas positivas por secuenciación y análisis bioquímico; este análisis permite identificar las proteínas que tienen un potencial de aplicación en diferentes sectores (medicina, agricultura o en industrias). Una de sus limitaciones, es que requiere la expresión de la función de interés en células hospederas y requiriere la expresión de todos los genes necesarios para dicha función. También depende de la magnitud de expresión de dichas actividades, debido a que con frecuencia, las clonas presentan una actividad baja. El análisis de secuencias, se basa en la utilización de secuencias conservadas de ADN para diseñar sondas de hibridación o cebadores de PCR para analizar las clonas de la biblioteca metagenómica que contiene las secuencias de interés. La secuenciación de clonas que contienen marcadores filogenéticos, tales como el gen 16s rRNA, permiten obtener información de los microorganismos de los cuales provienen dichas clonas (Schloss y Handelsman, 2003).

2.3.1.1 CLASIFICACIÓN DE BIBLIOTECAS METAGENÓMICAS

En función de la naturaleza del ADN exógeno que contienen, existen tres tipos de bibliotecas metagenómicas: Bibliotecas de expresión, de clonación y de ADN complementario (ADNc):

- **Bibliotecas de expresión:** Este tipo de bibliotecas son construidas para explorar actividades metabólicas a partir de fragmentos de ADN metagenómico (3 Kb a 20 Kb) de un hábitat, clonados en un vector. La mayoría de los genes estarán apropiadamente orientados y fuertemente influenciados por los promotores del vector de expresión, por consecuencia tendrán altas posibilidades de ser expresados y detectada su actividad (Guazzaroni *et. al.*, 2014; Ferrer *et. al.*, 2009; Torres, 2016).
- **Bibliotecas de clonación:** Se construyen utilizando vectores de clonación simples y que muestren una alta estabilidad llevando insertos largos (fósmidos y BACs), debido a que este tipo de bibliotecas contienen largos fragmentos de ADN metagenómico que oscila entre 40 Kb y 120 Kb. Se construyen para establecer relaciones filogenéticas entre individuos de una población y como herramienta complementaria a secuenciación de genomas completos (Streit y Daniel, 2010-b; Torres, 2016).
- **Bibliotecas de ADNc:** A diferencia de las bibliotecas de clonación o expresión (implementan ADN metagenómico) éste tipo de bibliotecas son construidas a partir del aislamiento de RNA (RNAm de larga duración) y su posterior conversión en ADNc. Éste banco de genes permite explorar genomas tanto procarióticos como eucarióticos, debido a que los insertos son carentes de intrones (Streit y Daniel, 2010; Torres, 2016).

2.3.1.1.1 VECTORES DE CLONACIÓN

Un vector es una molécula de ADN de doble cadena, con capacidad de albergar un fragmento de ADN exógeno. Los vectores se pueden clasificar en vectores de clonación y de expresión.

- **Vectores de clonación:** Son considerados de clonación, si su finalidad es el almacenamiento de secuencias y obtener grandes cantidades de ADN insertado. Suelen ser plásmidos, fagos, fagémidos, cósmidos y cromosomas artificiales bacterianos (BACs).
- **Vectores de expresión:** Son aquellos cuyo objetivo es producir un transcrito (ARN) o la proteína de éste transcrito. Pueden ser plásmidos o fagos (Salazar *et. al.*, 2013).

La elección de los vectores de clonación para la elaboración de una biblioteca metagenómica depende en gran parte de la longitud de los insertos. En el cual, para clonar fragmentos pequeños de ADN se pueden utilizar plásmidos que son apropiados para clonar fragmentos menores a 10 Kb y fagos lambda fragmentos de hasta 12 Kb. Cósmidos (25-35 Kb), fósmidos (25-40 Kb) o BACs (100-200 Kb) pueden ser utilizados para clonar fragmentos de ADN largos (Simon *et. al.*, 2009; Uchiyama y Miyazaki, 2009).

2.3.1.1.2 PROCESO DE ELABORACIÓN DE BIBLIOTECAS METAGENÓMICAS

Para elaborar una biblioteca metagenómica se debe tener una estrategia bien planeada, teniendo en consideración: el vector de clonación a utilizar, el organismo hospedero para la transformación; y en bibliotecas de expresión la estrategia de escaneo con el fin de optimizar la identificación de las actividades deseadas (Guazzaroni *et. al.*, 2014). El proceso general de elaboración consta de cuatro principales pasos y uno adicional en el caso bibliotecas de expresión (**Figura 9**):

- I. Obtención (recolección, excavación, muestreo, adquisición, etc.) de la muestra.
- II. Extracción y purificación del ADN del conjunto de microorganismos de la muestra a analizar.
- III. Fragmentación del ADN utilizando enzimas de restricción (EcoRI, PstI, Sau3AI, BamHI, BSp143I, etc.), para obtener insertos del tamaño apropiado (Kb) para el vector de clonación a implementar.
- IV. Ligación (T4DNA ligasa) de los fragmentos de ADN con el vector de clonación elegido. Seguido de la transformación a un cultivo celular (generando células recombinantes diferentes entre sí).
- V. **Para bibliotecas de expresión:** Una vez que la biblioteca de genes se construyó; se realizan diversos métodos de análisis para detectar las clonas con la actividad de interés (Cheng *et. al.*, 2014; Chow *et. al.*, 2012; Pereira de Castro *et. al.*, 2011; Torres, 2016).

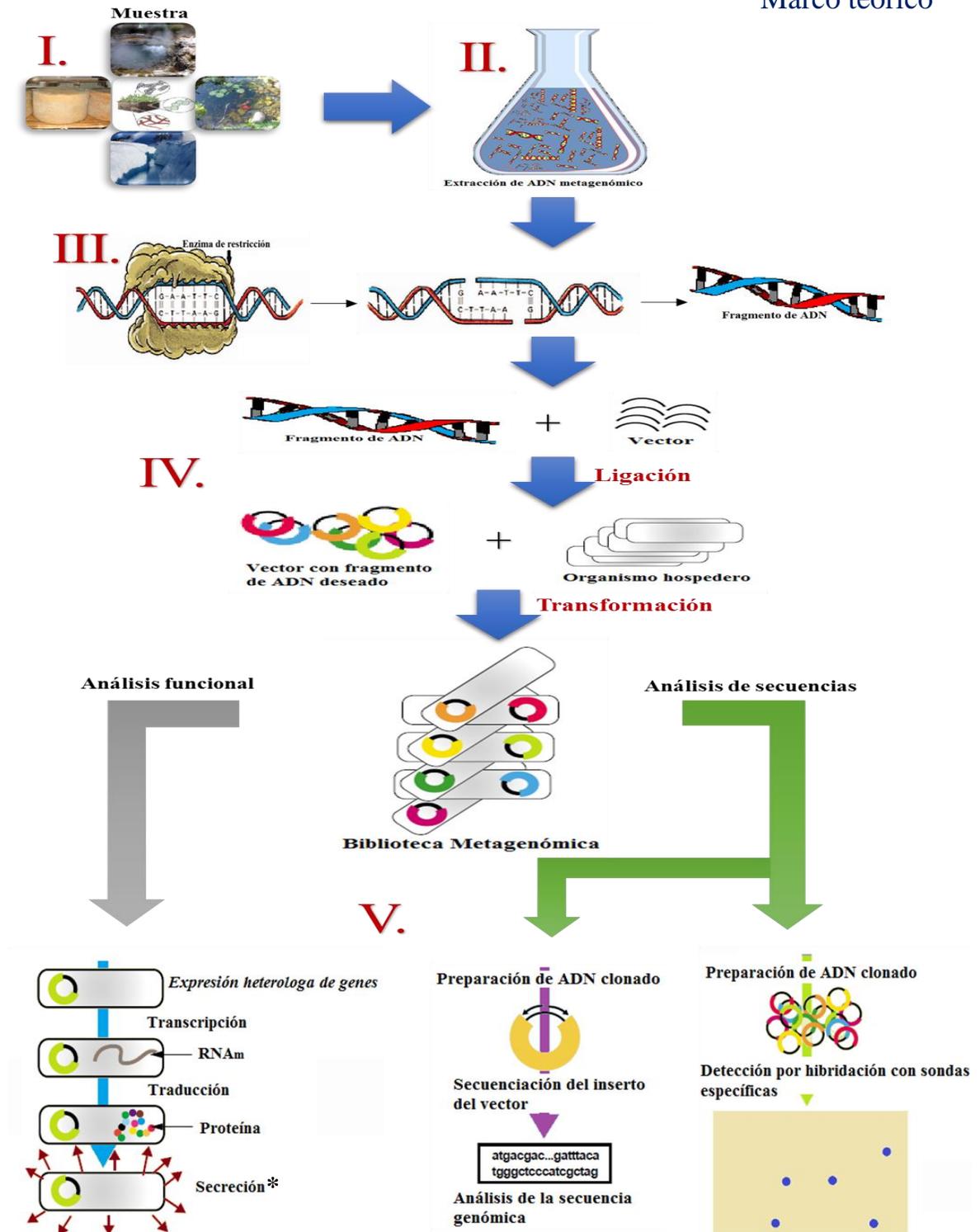


Figura 9. Representación general de la elaboración de una biblioteca metagenómica.

I. Muestra a analizar. II. Extracción y purificación de ADN metagenómico.

III. Fragmentación del ADN. IV. Ligación y transformación a cultivo celular.

V. Análisis de la biblioteca metagenómica (*En caso de ser una biblioteca de expresión*).

* No en todos los casos. Figura tomada y modificada de Schloss y Handelsman, 2003.

2.4 ANTECEDENTES

A partir de investigaciones realizadas en el grupo de trabajo sobre el tema de queso Cotija “Región de Origen”, se estudiaron factores en la manufactura de dicho producto que son determinantes en la composición de la microbiota. Se observó que la mayor parte de las características sensoriales finales del queso Cotija se producen mediante el metabolismo de la microbiota presente en las materias primas y de la microbiota procedente de la manipulación del queso durante su elaboración. García en el 2006 asoció el sabor y aroma del queso madurado a la actividad lipolítica producida por microorganismos presentes durante la maduración, identificó seis microorganismos (*Bacillus pumilus*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus piscifermentans*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida zeylanoides*) con la mayor actividad lipolítica.

Posteriormente, en el 2011 García obtuvo un panorama más detallado de la fuente y forma de inoculación de los microorganismos lipolíticos a lo largo del proceso de producción del queso Cotija. Identificó bacterias del género *Bacillus* y *Psychrobacter sp.* en el proceso de salado en seco. En la cuajada fresca encontró a *Bacillus pumilus*. *Lactococcus lactis* fue identificado en muestras de leche y cuajada salada. Teniendo así la identificación de microorganismos cultivables con actividad enzimática lipolítica.

En el 2012 Escobar estudió la relación de la composición de ácidos grasos totales y de ácidos grasos libres presentes en el material lipídico de diferentes zonas del queso Cotija. Observó una liberación homogénea de ácidos grasos, con preferencia a ácidos de cadena larga (C_{16:0}, C_{18:0}, C_{18:1} y C_{18:2}) de la matriz del queso, concluyendo que sin importar el gradiente de actividad de agua (a_w), pH o concentración de sales existen condiciones favorables para el desarrollo de microorganismos lipolíticos así como para su actividad enzimática.

En el 2014 Robles identificó una colección de microorganismos aislados del queso Cotija y de materias primas mediante la secuenciación completa del gen ribosomal 16S. Corroboró la presencia de tres bacterias (*Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Bacillus pumilus*) e identificó cinco nuevos microorganismos con actividad lipolítica (*Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus cohnii*, *Enterobacter sp.* y *Kocuria marina*).

Torres en el 2014 realizó una biblioteca metagenómica de expresión del queso Cotija para evaluar la actividad esterasa de la microbiota. Dicha biblioteca se elaboró a partir de 17 muestras de queso Cotija, a las cuales se le extrajo el ADN metagenómico, se realizó una digestión con la enzima BamHI y se obtuvieron fragmentos de un tamaño aproximado de 7-12 Kb, los cuales se extrajeron y purificaron. Los fragmentos se ligaron en el vector ZAP Express (ADN de fago lambda), el cual tiene 12 sitios únicos de clonación, en los cuales se pueden acomodar insertos de hasta 12 Kb de longitud, dicho vector puede ser extraído del fago λ en la forma de fagémido pBK-CMV, el cual es un vector de clonación que permite la expresión procariota dirigida por el promotor lac, el cual es inducible por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). El ADN recombinante fue empaquetado en fagos λ .

Posteriormente, se realizó una titulación de la biblioteca metagenómica, con el fin de cuantificar el número de clonas obtenidas (número de fagos en la biblioteca), obteniendo 136 950 Unidades Formadoras de Placa UFP y ~ 1.027 Gpb representados en la genoteca. Se amplificó la biblioteca para evitar que el ADN genómico a analizar fuera reactivo limitante y se obtuvieron 33.986 Gpb. Se realizó la detección de UFP positivas a hidrólisis de acetato de α -naftilo y Fast Blue RR (mediante la infección de células hospederas de *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' con fagos λ del banco metagenómico), después se realizó una ecisión en *E. coli* XL1-Blue MRF' (mediante una co-infección del fago λ con ayuda del fago ayudante M13 a la célula hospedera). Se formó el fagémido pBK-CMV recombinante y se introdujo a la cepa *Escherichia coli* XL0LR para su expresión por inducción con IPTG. Se confirmó la actividad esterasa de las clonas obtenidas en agar tributirina.

De dicha biblioteca se seleccionaron varias clonas por su capacidad para hidrolizar acetato de α -naftilo y tributirina, y con algunas se trabajó en este proyecto.

3. JUSTIFICACIÓN

Recientemente una de las estrategias realizadas por el grupo de trabajo para buscar nuevas enzimas con actividad esterasa a partir de la microbiota del queso Cotija, fue la elaboración de una biblioteca metagenómica funcional. Por esta razón, en la presente investigación se busca caracterizar enzimas aisladas de dicha biblioteca metagenómica de expresión por su presunta actividad lipolítica, para una posible aplicación biotecnológica.

4. HIPÓTESIS

Si las clonas aisladas de una biblioteca metagenómica de expresión del queso Cotija Región de Origen presentaron actividad positiva con acetato de α -naftilo, así como en agar tributirina, la enzima codificada en el inserto de cada clona será una triacilglicerol lipasa.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica de clonas de una biblioteca metagenómica de expresión, la cual se elaboró a partir de una muestra representativa de queso Cotija Región de Origen.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificación de actividad triacilglicerol lipasa o carboxilesterasa de clonas de la biblioteca metagenómica.
- Evaluación de actividad esterasa de la fracción intra y extracelular de clonas de la biblioteca metagenómica.
- Identificación y determinación del peso molecular de las proteínas con actividad esterasa mediante SDS-PAGE y zimografía.
- Evaluar bioquímicamente la actividad enzimática, en términos de su especificidad por sustratos, pH y temperatura óptima de actividad.

6. METODOLOGÍA

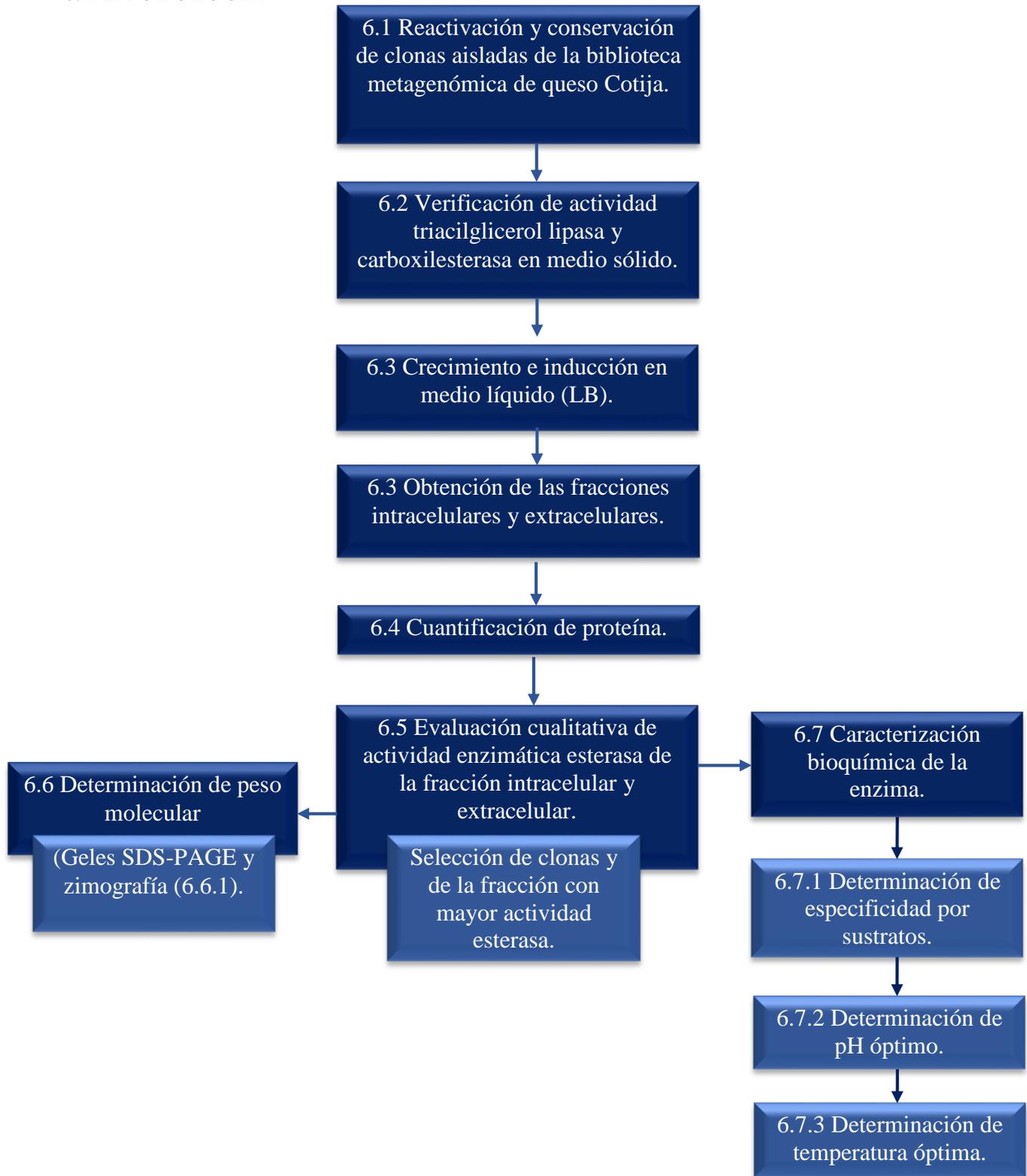


Figura 10. Estrategia experimental para la elaboración del proyecto.

6.1 REACTIVACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CLONAS

Se trabajó con las clonas en *E. coli* XL0LR de la biblioteca metagenómica de queso Cotija, que fueron seleccionadas por su capacidad de hidrolizar acetato de α -naftilo y tributirina.

Para la reactivación de las clonas se empleó medio caldo Luria-Bertani (LB) con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ([Anexo I - 1.1](#)).

Para la conservación de las clonas, se inocularon 15 mL de caldo LB con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con 30 μL de cada clona y se incubaron a 250 rpm, 37°C, durante 15 h, posteriormente se centrifugó a 10,000 g, a 4°C, durante 5 minutos. El paquete celular de cada clona, se resuspendió en 2.5 mL de caldo LB con glicerol (20 % v/v) y kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ([Anexo I - 1.2](#)). Se distribuyeron en tubos eppendorf estériles, los que se etiquetaron y se almacenaron en condiciones de ultracongelación a -70°C (Torres, 2016).

6.2 VERIFICACIÓN DE ACTIVIDAD TRIACILGLICEROL LIPASA Y CARBOXILESTERASA

Se verificaron las actividades enzimáticas triacilglicerol lipasa y carboxilesterasa, en medio sólido LB con aceite de olivo (1 %), kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (0.4 mM) ([Anexo I - 1.4](#)) y medio sólido LB con tributirina (1 %), kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e IPTG (0.4 mM) ([Anexo I - 1.3](#)), respectivamente, mediante la medición de halos de hidrólisis. La inoculación de cada clona fue mediante la técnica de picadura, cada medio se incubó a 37°C, durante 7 días (García, 2006; Torres, 2016).

6.3 OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN INTRACELULAR Y EXTRACELULAR

Para cada una de las clonas se obtuvo la fracción intracelular así como la fracción extracelular. Se partió de un pre-inóculo, para lo cual se añadieron 5 μL del glicerol de cada clona en 10 mL de caldo LB con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se incubaron a 250 rpm, 37°C, durante 15 h, posteriormente se transfirieron 3.8 mL de pre-inóculo a un matraz de 125 mL con 38 mL de caldo LB con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó a 250 rpm, 37°C, hasta obtener una $D.O._{600\text{nm}}$ 0.9 - 1.0. Posteriormente se tomaron 5 mL de cada medio para utilizarlo como control tiempo cero (t_0) antes de inducir la producción de la enzima; para dicha inducción se adicionó IPTG al medio restante para obtener una concentración

final de 0.4 mM. Se incubó cada medio (T_0 y con IPTG) a 250 rpm, 37°C, durante 3 h, posteriormente se centrifugó a 10,000 g, a 4°C, durante 15 min. El sobrenadante (fracción extracelular) obtenido, se almacenó en tubos falcón estériles a -20°C. El paquete celular obtenido, se resuspendió en 1 mL de buffer de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.5 (**Anexo I - 2.2**), se centrifugó a 10,000 g, a 4°C, durante 15 min y se resuspendió en 10 mL de solución de resuspensión (EDTA 1 mM, NaCl 0.3 M y 10 % (v/v) de glicerol, en buffer de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.5) (**Anexo I - 2.3**). Posteriormente se sonicó cada muestra en un ultrasonicador (Fisher scientific, 550 sonic dismembrator) con pulsos de 20 seg, con 20 seg de descanso, a nivel 3 de amplitud durante 7 min, a 4°C, pasado el tiempo, cada muestra se centrifugó a 30,000 g, a 4°C, durante 10 min; al sobrenadante obtenido (fracción intracelular) se le realizaron alícuotas en tubos eppendorf estériles, se rotularon y almacenaron a -20°C (Peña, 2009).

La fracción intra y extracelular del control negativo (microorganismo hospedero de la biblioteca metagenómica) se obtuvo implementando la metodología antes descrita, a diferencia que se utilizó el medio caldo LB con tetraciclina (12.5 µg/mL) (**Anexo I - 1.5**) (Peña, 2009; Torres, 2016).

6.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

La cuantificación de proteína de la fracción intra y extracelular de cada clona, se realizó en un espectrofotómetro (Biotek, epoch) a una longitud de onda de $\lambda=595_{nm}$, mediante la técnica de Bradford (Biorad) con algunas modificaciones. Dichas determinaciones se realizaron en una microplaca de 96 pozos utilizando 160 µL de muestra con 40 µL de reactivo de Bradford (Biorad). Como estándar se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) (Bradford, 1976; Peña, 2009).

6.5 EVALUACIÓN CUALITATIVA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ESTERASA DE LA FRACCIÓN INTRACELULAR Y EXTRACELULAR

La determinación cualitativa de la actividad enzimática se realizó en microplaca de 96 pozos, ajustando la cantidad de proteína de las fracciones intra y extracelulares de cada clona a la misma concentración con buffer de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.5. Para la reacción se utilizó un volumen de 75 µL de muestra (fracción intra o extracelular) con 75 µL de

sustrato A (acetato de α -naftilo 3 mM y 10 % (v/v) de acetona, en buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5) ([Anexo I - 3.2](#)) y 75 μ L de reactivo revelador R (Fast Red TR 1 mM y 0.1 % (v/v) de tritón X-100, en buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5) ([Anexo I - 2.4](#)); teniendo un tiempo de reacción de 20 min, a temperatura ambiente (Peña, 2009).

Posteriormente se seleccionaron las clonas que presentaron cualitativamente mayor actividad enzimática.

6.6 DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR

Para todos los ensayos de electroforesis de proteínas, las fracciones intracelulares de cada clona evaluada se obtuvieron según la metodología (6.3) descrita anteriormente, con modificaciones respecto a la cantidad inicial de pre-inóculo, tamaño de matraz y medio inicial, con el fin de obtener una mayor concentración de proteína (fracción intracelular) en el volumen final (10 mL). Para ello (conservando las mismas proporciones) se realizó un pre-inóculo de 15 μ L de cada clona en 30 mL de caldo LB con kanamicina (50 μ g/mL), se incubaron a 250 rpm, 37°C, durante 15 h, posteriormente se inoculó un matraz de 500 mL con 150 mL de caldo LB con kanamicina (50 μ g/mL) con 15 mL de pre-inóculo.

La determinación de peso molecular de las enzimas de la fracción intracelular se realizó mediante electroforesis de proteínas, para lo cual se prepararon geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12 % (v/v) de solución de acrilamida en gel separador ([Anexo I - 4.9](#)) y 4 % (v/v) de solución de acrilamida en gel concentrador ([Anexo I - 4.10](#)); se utilizaron estándares de bajo peso molecular (Biorad) ([Anexo I - 4.11](#)). La tinción del gel se realizó con solución teñidora de azul de Coomassie ([Anexo I - 4.12](#)) en agitación, a temperatura ambiente, durante 24 h. La electroforesis se corrió a 80 mV, a temperatura ambiente, durante 20 min. Pasado este tiempo se corrió a 120 mV, a 4°C, durante 2-3 horas (deteniendo la aplicación de voltaje antes de que el frente de corrida salga del gel) en una cámara vertical Mini-protean (Biorad). El gel se destiñó empleando solución destiñidora ([Anexo I - 4.13](#)) en agitación, hasta observar la aparición de bandas color azul.

6.6.1 ZIMOGRAFÍA

Simultáneamente en la misma corrida se realizaron los ensayos de zimografía para la detección de actividad esterasa. Una vez realizada la electroforesis, el gel SDS-PAGE destinado para el ensayo de zimografía, se lavó por inmersión en agua desionizada por 3 min. Posteriormente se realizó un lavado por 30 min, con tritón X-100 al 5 % (v/v) (Anexo I - 4.14), posteriormente se retiró la solución anterior y los geles se dejaron inmersos en tritón X-100 al 0.5 % (v/v) en agitación, a temperatura ambiente, durante 24 h. Pasado este tiempo, se adicionó buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5, durante 30 min.

Para revelar la actividad de la enzima “*in situ*” en gel SDS-PAGE, se incubó el gel con sustrato A (acetato α -naftilo 3 mM y 10 % (v/v) de acetona, en buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5), a temperatura ambiente, durante 15 min. Pasado este tiempo se adicionó sin retirar la solución anterior, el reactivo revelador B (Fast Blue RR 1 mM y 0.1 % (v/v) de tritón X-100, en buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5) (Anexo I - 2.5). La actividad esterasa se detectó por la aparición de bandas color violeta, una vez observadas, el gel se almacenó con agua desionizada y filtrada a 4 °C (Peña, 2009).

6.7 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA

La caracterización bioquímica de las enzimas en estudio, se realizó mediante el método espectrofotométrico (Peña, 2009) utilizando ésteres de *p*-nitrofenilo, con un volumen total en el ensayo de 200 μ L (90 μ L de agua desionizada filtrada, 20 μ L de buffer 0.5 M, 20 μ L de sustrato 1 mM y 70 μ L de enzima). Las mediciones de absorbancia a $\lambda=420_{\text{nm}}$ para cada determinación se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro (Biotek, epoch), dichas lecturas se corrigieron con los valores de autohidrólisis de los controles.

La curva patrón para cada valor de pH utilizado se realizó con un stock de *p*-nitrofenol grado espectrofotométrico 1 mM (Anexo I - 3.3).

6.7.1 DETERMINACIÓN DE ESPECIFICIDAD POR SUSTRATOS

En la determinación de especificidad por sustratos del ensayo, se utilizaron ésteres de *p*-nitrofenilo con grupos acilo de cadena corta (acetato de *p*-nitrofenilo (C₂), butirato de *p*-nitrofenilo (C₄), octanoato de *p*-nitrofenilo (C₈)) y larga (decanoato de *p*-nitrofenilo (C₁₀), dodecanoato de *p*-nitrofenilo (C₁₂), hexadecanoato de *p*-nitrofenilo (C₁₆)) (Anexo I - 3.4) a una concentración final de 0.1 mM, a temperatura ambiente y pH 7 (buffer de fosfato de potasio (Anexo I - 2.8)).

6.7.2 DETERMINACIÓN DE pH ÓPTIMO

La determinación de pH óptimo del ensayo se realizó con la medición de la actividad enzimática a temperatura ambiente, entre 18-30 min, utilizando el sustrato óptimo del ensayo para cada enzima a una concentración final de 0.1 mM, en un rango de pH de 5 a 9, con buffer de acetatos (pH 5), buffer de fosfato de potasio (pH 6 y 7) y buffer tris base (pH 8 y 9) (Anexo I – 2.6 a 2.9) a una concentración final de 0.05 M.

6.7.3 DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA ÓPTIMA

En la determinación de temperatura óptima del ensayo, se utilizaron condiciones idóneas del ensayo (sustrato y pH óptimos) para cada enzima, variando las condiciones de temperatura en un mini baño seco (Benchmark) a 25°C, 30°C, 40°C y 50°C, con un tiempo de 10-20 min.

7. RESULTADOS

7.1 EXPRESIÓN ENZIMÁTICA

Las clonas esterasa positivas aisladas de la biblioteca metagenómica de expresión del queso Cotija Región de Origen, fueron nombradas como Est-A, Est-B, Est-C, Est-D, Est-E y Est-F. A partir de los glicerolos existentes se realizó su reactivación y conservación para la realización del presente proyecto.

Se procedió a observar la expresión de la actividad enzimática esterasa en medio sólido LB con inductor (IPTG) (Figura 11), incubados a 37°C, durante 7 días. Utilizando como control negativo a *Escherichia coli* XL0LR, el cual es el microorganismo hospedero de la biblioteca metagenómica.

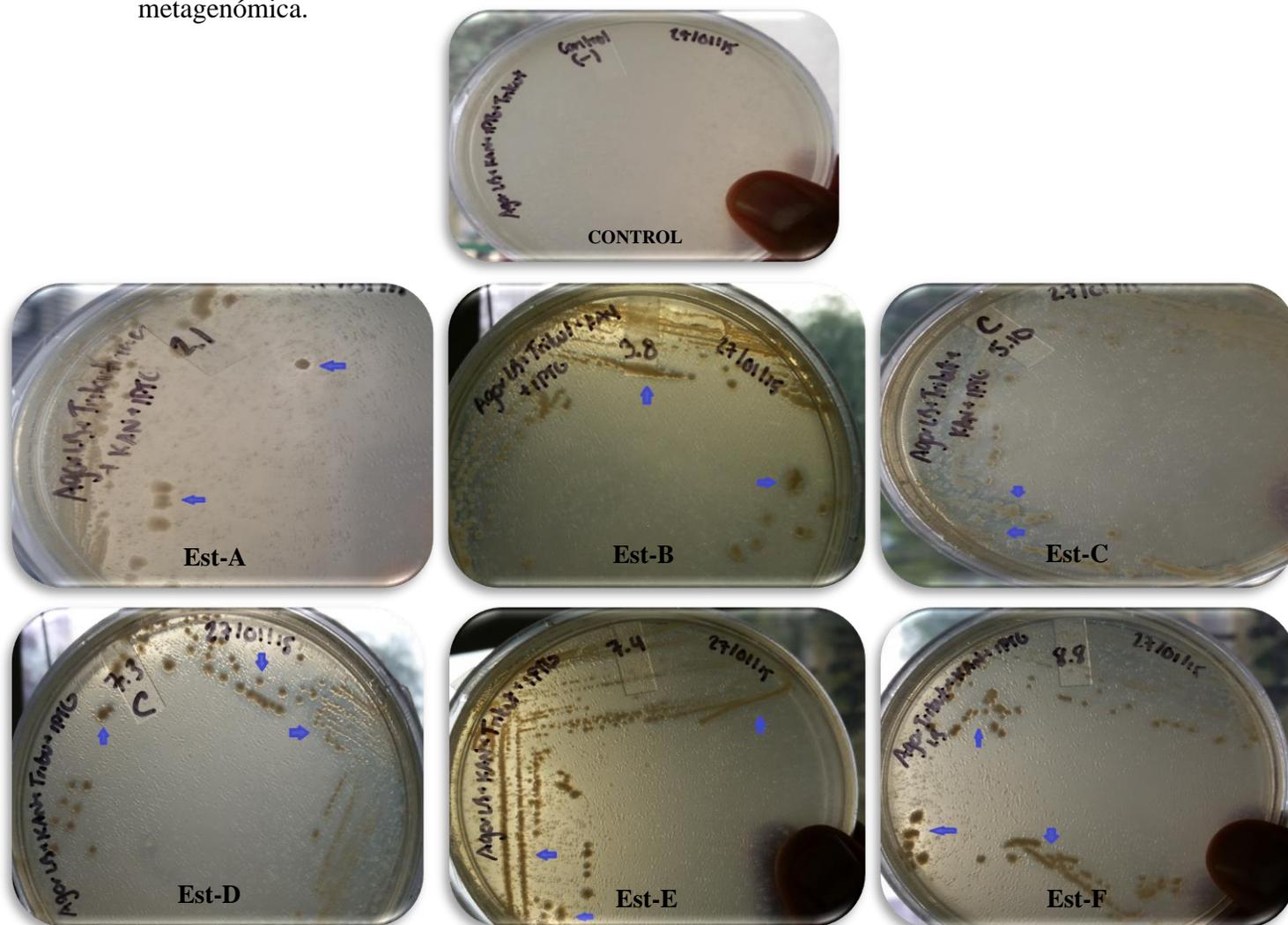


Figura 11. Medio sólido LB con tributirina (1 %), kanamicina (50 µg/mL) e IPTG (0.4 mM).

Como se observa en la **Figura 11**, la expresión enzimática esterasa se presenta en cada una de las clonas evaluadas. Por lo que dicha expresión confirma que las clonas no se vieron afectadas (expulsión de fagémido) por el tiempo tan prolongado (año 2014) en el cual estuvieron almacenadas antes de su reactivación.

Se observa que el control negativo (*E. coli* XL0LR) no presentó crecimiento debido a que el medio contenía kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y tiene un efecto inhibitorio para dicho microorganismo. Éste al no contener el fagémido, no presenta resistencia a kanamicina (**Figura 11**).

7.2 IDENTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Como un primer acercamiento para identificar a las enzimas triacilglicerol lipasas y/o carboxilesterasas, se sembraron las clonas en medio sólido LB con tributirina, sustrato de carboxilesterasas, ya que contiene ácidos grasos de cadena corta, y con aceite de olivo, sustrato de triacilglicerol lipasas, ya que contiene ácidos grasos de cadena larga, para determinar el tipo de actividad enzimática esterasa mediante la medición por triplicado de halos de hidrólisis en éstos dos distintos medios (**Figuras 12 y 13**).

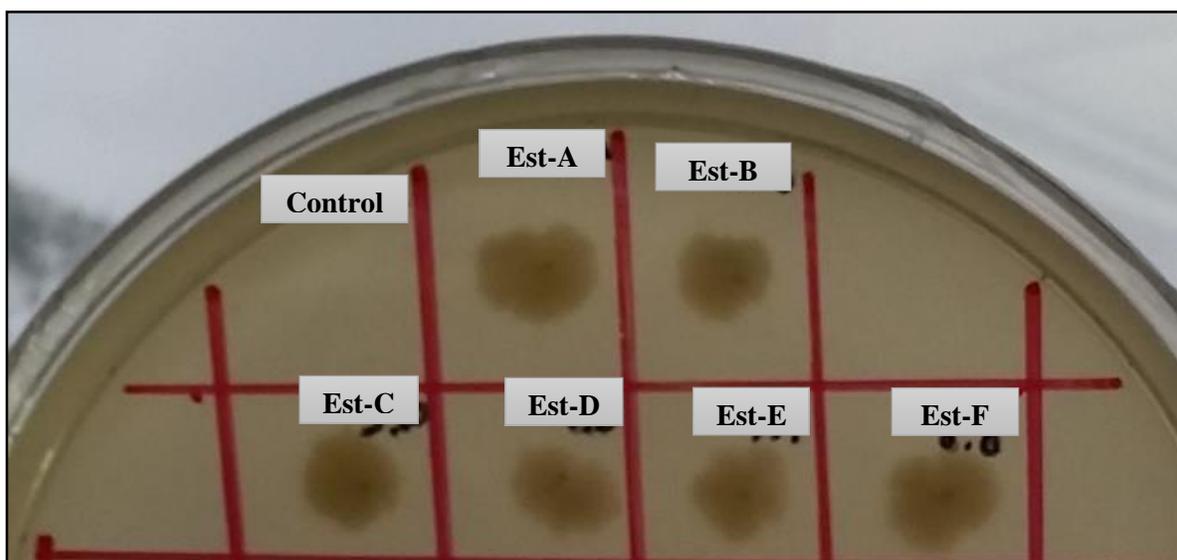


Figura 12. Inoculación de clonas por técnica de picadura en medio sólido LB con aceite de olivo (1 %), kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e IPTG (0.4 mM) incubado a 37°C, durante 7 días.

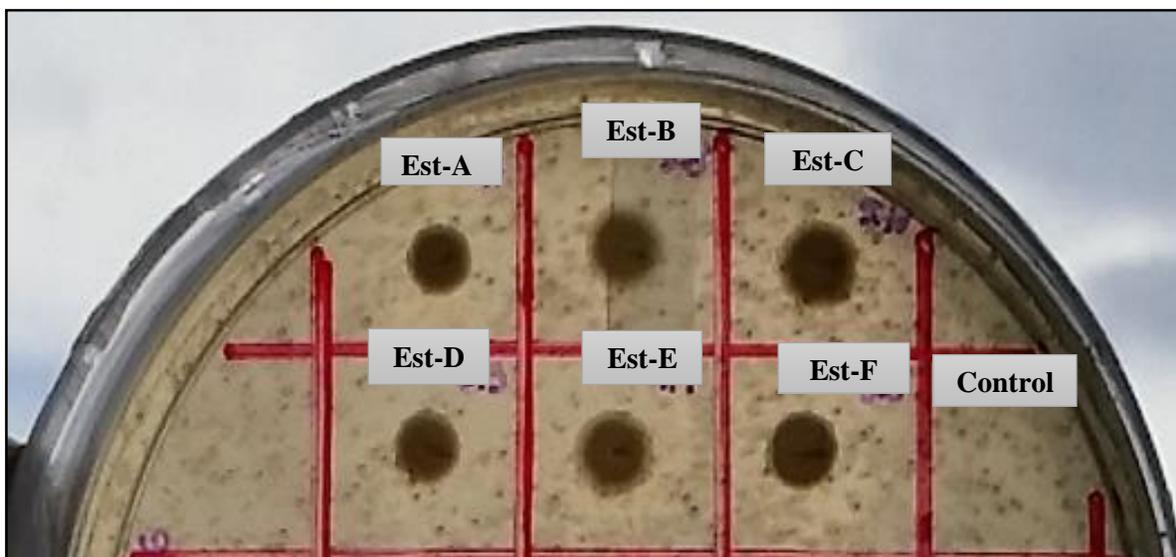


Figura 13. Inoculación de clones por técnica de picadura en medio sólido LB con tributirina (1%), kanamicina (50 $\mu\text{g/mL}$) e IPTG (0.4 mM) incubado a 37°C, durante 7 días.

Como se observa en la [Figura 12](#) las clonas sembradas en medio sólido LB con aceite de olivo como sustrato, no presentan actividad enzimática evidente (como halos de hidrólisis alrededor de las colonias), por lo que aparentemente dichas clonas carecen de enzimas triacilglicerol lipasas. Sin embargo, en la [Figura 13](#) se presentan los resultados obtenidos de la actividad enzimática en el medio sólido LB con tributirina como sustrato, como se observa hay formación de halos de hidrólisis. Estos resultados nos dan un indicio de que las enzimas producidas por las clonas Est-A a Est-F tienen preferencia por ésteres de ácidos grasos de cadena corta, por lo tanto, serían carboxilesterasas. Por lo anteriormente expuesto, de aquí en adelante se denominará a la actividad enzimática, como carboxilesterasa.

Los resultados de la medición del diámetro de halo de hidrólisis y del diámetro de colonia para el medio con tributirina (actividad carboxilesterasa) se muestran en la [Tabla 2](#), se presentan mediciones independientes, el promedio de la relación diámetro halo/colonia y desviación estándar. Se puede observar que la clona Est-D presenta una mayor actividad enzimática con una menor biomasa, mientras que las clonas Est-B, Est-E y Est-F presentan poca actividad enzimática con mayor producción de biomasa.

Tabla 2. Diámetro de colonias y halos de actividad enzimática en medio sólido LB con tributirina (1 %), kanamicina (50 µg/mL) e IPTG (0.4 mM) incubados a 37°C, durante 7días.

Clona	θ Colonia (cm)			θ Halo (cm)			Promedio (θ Halo / θ Colonia)
	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Medición 1	Medición 2	Medición 3	
Est-A	0.6	0.5	0.4	1.1	1.0	1.0	2.11 ± 0.35
Est-B	0.4	0.5	0.5	0.9	0.8	1.0	1.95 ± 0.33
Est-C	0.4	0.6	0.6	0.9	1.3	1.2	2.14 ± 0.13
Est-D	0.4	0.5	0.4	1.2	1.3	1.0	2.70 ± 0.26
Est-E	0.5	0.5	0.6	1.0	1.1	1.1	2.01 ± 0.18
Est-F	0.5	0.5	0.5	1.1	1.0	0.9	2.00 ± 0.20

7.3 EVALUACIÓN CUALITATIVA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CARBOXILESTERASA DE LAS FRACCIONES INTRA Y EXTRACELULARES

Se cuantificó la cantidad de proteína mediante el método de Bradford (Biorad), tanto de la fracción intracelular como de la fracción extracelular de cada clona en estudio, incluyendo dos controles negativos *E. coli* XL0LR y *Escherichia coli* XL1-Blue MRF'. Posteriormente se procedió a ajustar la misma cantidad de proteína en todas las muestras, utilizando como valor base la cantidad menor de proteína cuantificada: 577.23 ± 32.87 µg de proteína / mL de fracción intracelular y 8.32 ± 0.43 µg de proteína / mL de fracción extracelular.

Se determinó cualitativamente, por duplicado, la actividad enzimática de ambas fracciones en una microplaca de 96 pozos con acetato de α-naftilo como sustrato y Fast Red TR como reactivo revelador (Figuras 14 y 15). Se eligieron dos clonas cuya actividad enzimática observada como complejo colorido rojizo (complejo colorante diazo) fuera más intensa.

Se observa que la fracción intracelular (Figura 14) presenta una mayor actividad enzimática en comparación con la fracción extracelular (Figura 15), probablemente debido a que los insertos de dichas clonas podrían carecer de algún péptido señal, que direccionara a la proteína sintetizada hacia el exterior de la célula.

Las clonas **Est-A** y **Est-C** fueron elegidas para continuar con las actividades y objetivos consecuentes del presente proyecto.

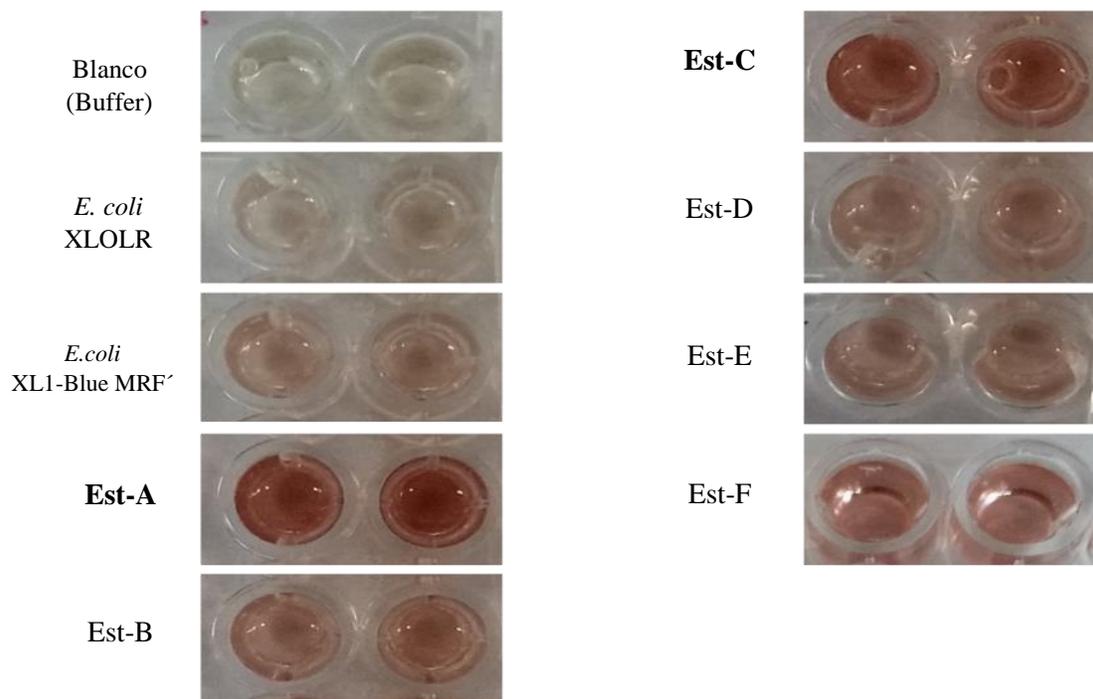


Figura 14. Actividad enzimática en microplaca de la **fracción intracelular** (con 3 h de inducción con IPTG) frente a acetato de α -naftilo 3 mM, usando como revelador Fast Red FR 1 mM. Tiempo de reacción 20 min, a temperatura ambiente.

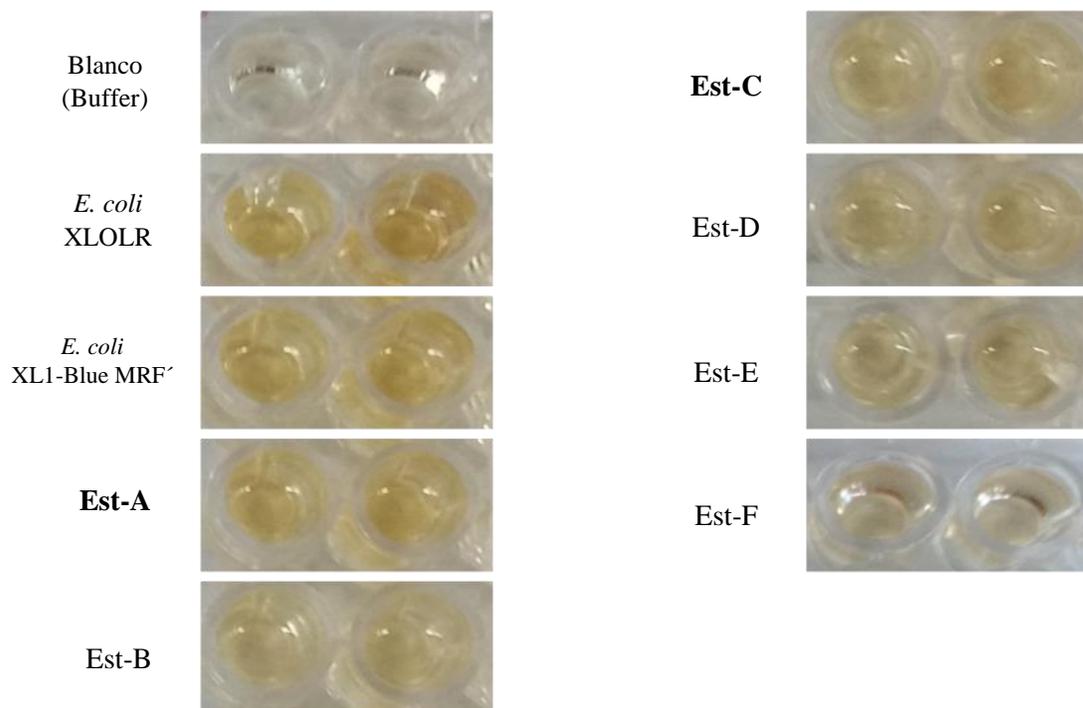


Figura 15. Actividad enzimática en microplaca de la **fracción extracelular** (con 3 h de inducción con IPTG) frente a acetato de α -naftilo 3 mM, usando como revelador Fast Red FR 1 mM. Tiempo de reacción 20 min, a temperatura ambiente.

De las clonas seleccionadas, Est-A y Est-C, se determinó cualitativamente la actividad enzimática frente acetato de α -naftilo de la fracción intracelular tiempo cero (t_0) y de la fracción inducida 3 h con IPTG (Figura 16).

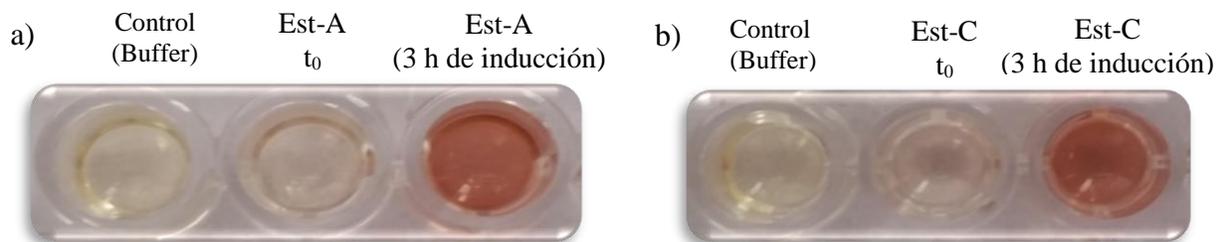


Figura 16. Actividad enzimática en microplaca frente a acetato de α -naftilo 3 mM, de la fracción intracelular t_0 y 3 h después de inducción de la clona Est-A (a) y Est-C (b). Tiempo de reacción 20 min, a temperatura ambiente.

En la Figura 16 se observa que a los 20 min de reacción tanto la clona Est-A como la clona Est-C, presentan actividad enzimática para las fracciones intracelulares inducidas 3 h en comparación con las muestras sin inductor, con lo que se comprueba que la síntesis de la proteína de interés codificada en el inserto de cada clona se produce sólo al inducir con IPTG.

7.4 DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR

La determinación de peso molecular de las proteínas con actividad enzimática frente al sustrato cromogénico acetato de α -naftilo de la fracción intracelular de las clonas elegidas (Est-A y Est-C), se realizó mediante la técnica de electroforesis de proteínas y zimografía.

Para ello, se ajustó la cantidad de proteína cargada en cada pozo del gel de poliacrilamida a una concentración de 50 μ g. Se utilizaron estándares de bajo peso molecular (Biorad) y la tinción del gel, se realizó con azul de Coomassie. A su vez, en la misma corrida se realizaron ensayos de zimografía para la detección de actividad esterasa, ajustando a una concentración de 394 μ g de proteína para las fracciones intracelulares de cada clona en estudio. Se reveló la actividad “*in situ*” en cada gel, con acetato de α -naftilo 3 mM y Fast Blue RR 1 mM como reactivo revelador (Figuras 17 y 18).

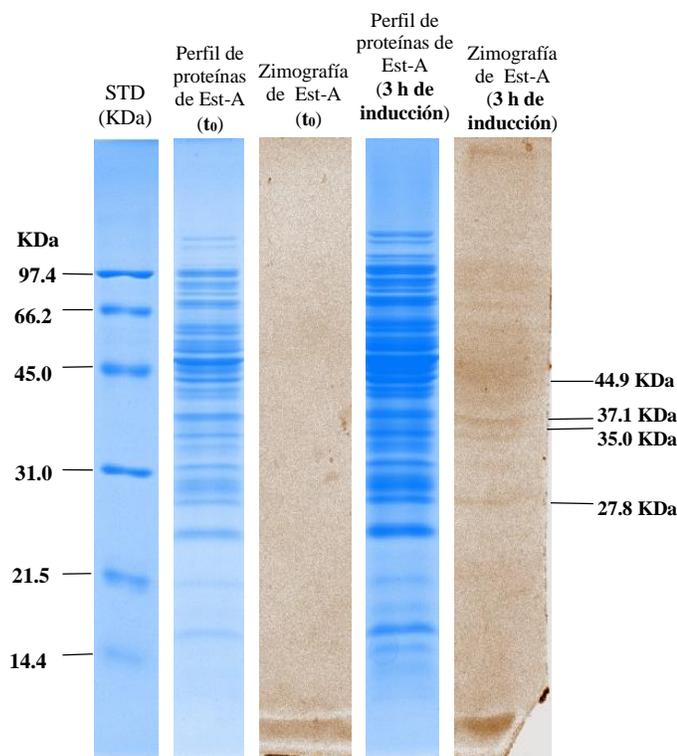


Figura 17. Electroforesis de proteínas y zimografía de la **fracción intracelular** de las muestras t_0 y 3 h de inducción de la clona **Est-A**. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12 % de gel separador y 4 % de gel concentrador.

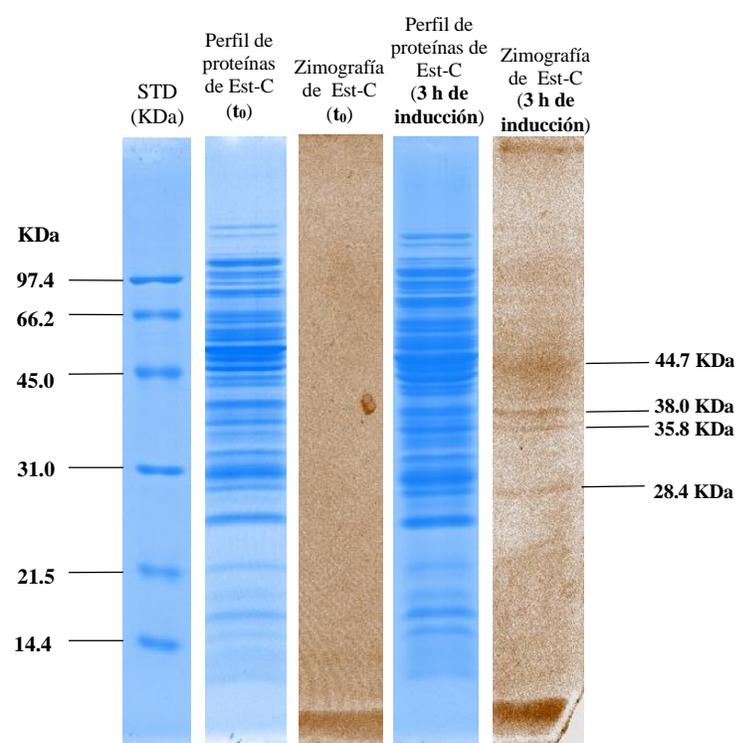


Figura 18. Electroforesis de proteínas y zimografía de la **fracción intracelular** de las muestras t_0 y 3 h de inducción de la clona **Est-C**. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12 % de gel separador y 4 % de gel concentrador.

Comparando el patrón de bandeado obtenido de los geles con tinción de Coomassie con las bandas obtenidas del ensayo de zimografía mediante la implementación del Software Image Lab 5.2.1 (Biorad Laboratories, 2014), se observa que la clona Est-A (**Figura 17**) presenta una proteína con gran actividad enzimática esterasa a un peso aproximado es de 44.9 KDa, también se presenta una proteína con menor actividad enzimática en un peso de 37.1 KDa y dos proteínas con poca actividad de 35.0 y 27.8 KDa respectivamente. En el caso de clona Est-C (**Figura 18**) se observan 4 proteínas con actividad enzimática, dos de ellas con mayor actividad con un peso aproximado de 44.7 KDa y 38.0 KDa, y dos proteínas con menor actividad en un peso de 35.8 y 28.4 KDa. En ambas muestras analizadas, se observa que en el perfil de proteínas, existe una ligera diferencia cuando se induce 3 h cada muestra, en comparación con el t_0 , ya que se observan algunas bandas más engrosadas indicativas de

inducción. En cuanto al zimograma de ambos casos, no se muestran proteínas con actividad enzimática en t_0 .

Entre ambas clonas (Figura 17 y 18) se tienen proteínas con pesos y actividades enzimáticas muy similares (después de 3 h de inducción). Este es un resultado no esperado, debido a que Torres, 2016 reporta que el inserto de cada clona elegida son diferentes a nivel de secuencia de ADN.

7.5 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA

7.5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA PREPARACIÓN ENZIMÁTICA CRUDA DE LA CLONA Est-A

7.5.1.1 DETERMINACIÓN DE ESPECIFICIDAD POR SUSTRATOS

Para la caracterización bioquímica de la fracción intracelular de la clona Est-A, se le realizó la determinación de sustrato óptimo del ensayo, utilizando ésteres de *p*-nitrofenilo con grupos acilo de cadena corta ($C_2 - C_8$) y de cadena larga ($C_{10} - C_{16}$) a una concentración final de 0.1 mM, realizando lecturas a temperatura ambiente y utilizando condiciones neutras de pH. Una vez cuantificado el compuesto colorido amarillo (*p*-nitrofenol), obtenido de la reacción de hidrólisis del enlace éster de cada sustrato por la acción enzimática, los valores promedio de cada lectura se graficaron (Anexo III – Figura 30) con respecto al tiempo. Se determinó la actividad volumétrica “U/mL de fracción intracelular” (no presentado) y la actividad específica “U/mg de proteína” para determinar el sustrato óptimo del ensayo (Tabla 3); las unidades de actividad “U”, se representan como μmol de *p*-nitrofenol liberado por min.

Tabla 3. Actividad específica y relativa de la fracción intracelular de la clona Est-A frente a diversos sustratos (ésteres de *p*-nitrofenilo), a temperatura ambiente y pH 7.

Sustrato a pH 7	Actividad Específica (U (μmol <i>p</i> -nitrofenol/min) / mg de proteína)	% Actividad relativa
Acetato de <i>p</i> -nitrofenilo	$3.24 \times 10^{-4} \pm 1.57 \times 10^{-5}$	$70.1 \pm 3.4^{(B)}$
Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	$4.62 \times 10^{-4} \pm 5.64 \times 10^{-6}$	$100.0 \pm 1.2^{(A)}$
Octanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	$3.55 \times 10^{-4} \pm 1.13 \times 10^{-5}$	$76.8 \pm 2.4^{(B)}$
Decanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	$1.90 \times 10^{-4} \pm 3.81 \times 10^{-5}$	$41.2 \pm 8.3^{(C)}$
Dodecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	$1.32 \times 10^{-4} \pm 8.45 \times 10^{-6}$	$28.5 \pm 1.8^{(D)}$
Hexadecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	$5.37 \times 10^{-5} \pm 1.76 \times 10^{-5}$	$11.6 \pm 3.8^{(E)}$

Los valores mostrados son valores medios \pm desviación estándar, derivados de tres experimentos independientes.
Una letra diferente indica diferencia estadísticamente significativa con α 0.05.

Como se observa en la **Tabla 3**, la mayor actividad específica a pH 7 se presenta frente al sustrato de cadena corta butirato de *p*-nitrofenilo (C₄). Al realizar un análisis estadístico (Análisis de varianza (**Anexo III – Tabla 11**)) mediante la implementación del Software Minitab 17.0.2 (Minitab, 2013), con una $\alpha=95$ %, se observa que existe diferencia significativa entre los sustratos utilizados. Al realizar un análisis de Mínima Diferencia Significativa (LSD, por sus siglas en inglés) de Fisher a un 95 % de confianza (**Anexo III – Tabla 12**), la actividad específica obtenida para el sustrato butirato de *p*-nitrofenilo es estadísticamente diferente a los demás sustratos evaluados, por lo que para la clona Est-A dicho sustrato es el óptimo.

En la **Figura 19** se presentan gráficamente los valores de % de actividad relativa (**Tabla 3**), en el cual el 100 % corresponde al mayor valor obtenido de actividad específica ($4.62 \times 10^{-4} \pm 5.64 \times 10^{-6}$ U/mg de proteína). Se observa que la clona Est-A presenta una mayor actividad frente a ésteres de *p*-nitrofenilo con grupos acilo de cadena corta (C₂ - C₈) en comparación con grupos de cadena larga. Teniendo una actividad enzimática de tipo carboxilesterasa.

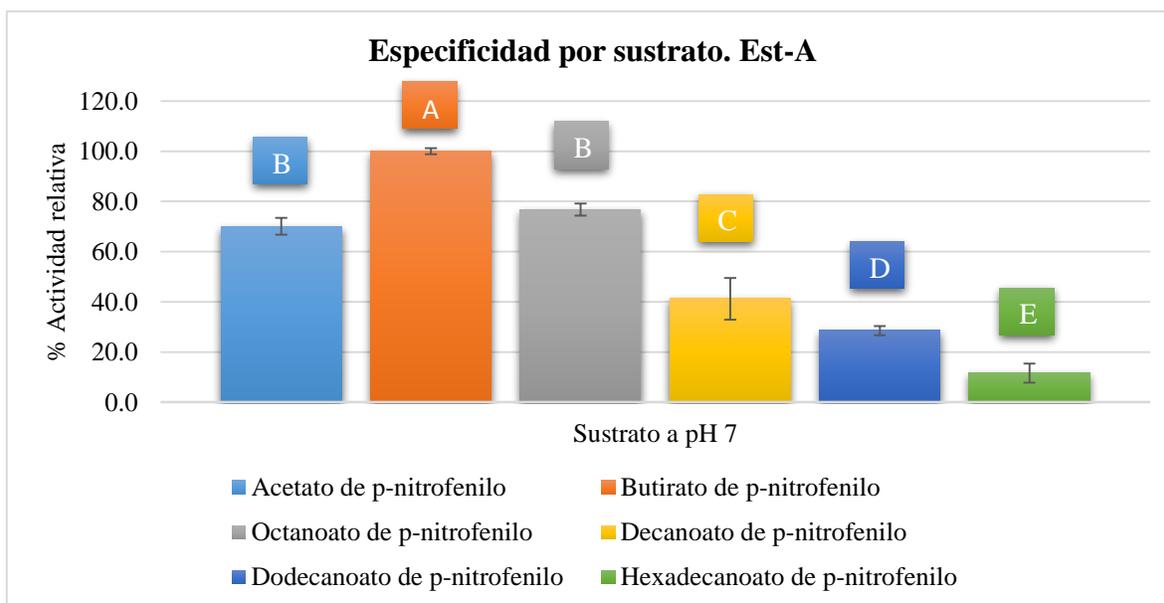


Figura 19. Especificidad por sustrato para la clona Est-A, a temperatura ambiente y pH 7.

7.5.1.2 DETERMINACIÓN DE pH ÓPTIMO

En la determinación de pH óptimo del ensayo para la fracción intracelular de la clona Est-A, se utilizó el sustrato óptimo (butirato de *p*-nitrofenilo (C₄)) a una concentración final de 0.1 mM, a temperatura ambiente, en un rango de pH de ensayo de pH 5 a pH 9. Una vez cuantificado el producto de hidrólisis (*p*-nitrofenol) del sustrato utilizado, por acción enzimática, se graficaron los valores promedio de cada medición (Anexo III – Figura 31). Se determinó la actividad volumétrica “U/mL de fracción intracelular” (no presentado) y la actividad específica “U/mg de proteína” para determinar el pH óptimo del ensayo (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad específica y relativa de la fracción intracelular de la clona Est-A frente al sustrato butirato de *p*-nitrofenilo, a temperatura ambiente, a diversos valores de pH.

pH / butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	Actividad Específica (U (μmol <i>p</i> -nitrofenol/min) / mg de proteína)	% Actividad relativa
pH 5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 ^(D)
pH 6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 ^(D)
pH 7	1.38x10 ⁻⁴ ± 1.02x10 ⁻⁵	42.9 ± 3.2 ^(C)
pH 8	1.81x10 ⁻⁴ ± 1.56x10 ⁻⁵	56.1 ± 4.8 ^(B)
pH 9	3.23x10 ⁻⁴ ± 5.67x10 ⁻⁶	100.0 ± 1.8 ^(A)

Los valores mostrados son valores medios ± desviación estándar, derivados de tres experimentos independientes. Una letra diferente indica diferencia estadísticamente significativa con α 0.05.

En la Tabla 4, se observa que la mayor actividad específica ocurre a pH 9 (3.23x10⁻⁴ ± 5.67 x10⁻⁶ U/mg de proteína). Al realizar un análisis estadístico (Anova) y un análisis por el método LSD de Fisher, mediante la implementación del Software Minitab 17.0.2, al 95 % de confianza para ambos casos (Anexo III – Tablas 15 y 16), se prueba que estadísticamente existe diferencia entre cada valor de actividad específica y que en relación al pH óptimo del ensayo, el pH 9 es estadísticamente diferente a los demás valores evaluados. Por lo que dicha clona presenta frente al sustrato butirato de *p*-nitrofenilo un pH óptimo de 9.

Al comparar el valor de actividad específica obtenido en la determinación de sustrato óptimo (4.62x10⁻⁴ ± 5.64x10⁻⁶, Tabla 3) con respecto al obtenido en la determinación de pH óptimo a las mismas condiciones (1.38x10⁻⁴ ± 1.02x10⁻⁵, Tabla 4), se esperaría que fueran similares, pero se observa que la actividad es menor. Lo cual probablemente se deba al tiempo transcurrido entre cada determinación (~2 semanas). Lo que indicaría una baja estabilidad de la actividad enzimática.

En la **Figura 20** se presentan gráficamente los valores de % de actividad relativa (**Tabla 4**), en el cual el 100 % corresponde al mayor valor obtenido de actividad específica ($3.23 \times 10^{-4} \pm 5.67 \times 10^{-6}$ U/mg de proteína). Se observa que la clona Est-A presenta una mayor actividad carboxilesterasa frente al sustrato evaluado a valores de pH básicos, que en comparación con valores de pH ácidos para los cuales no se detectó actividad, debido a que al realizar la determinación a valores menores de pH 7 las proteínas del extracto tendían a precipitar y por consiguiente perdían la actividad.

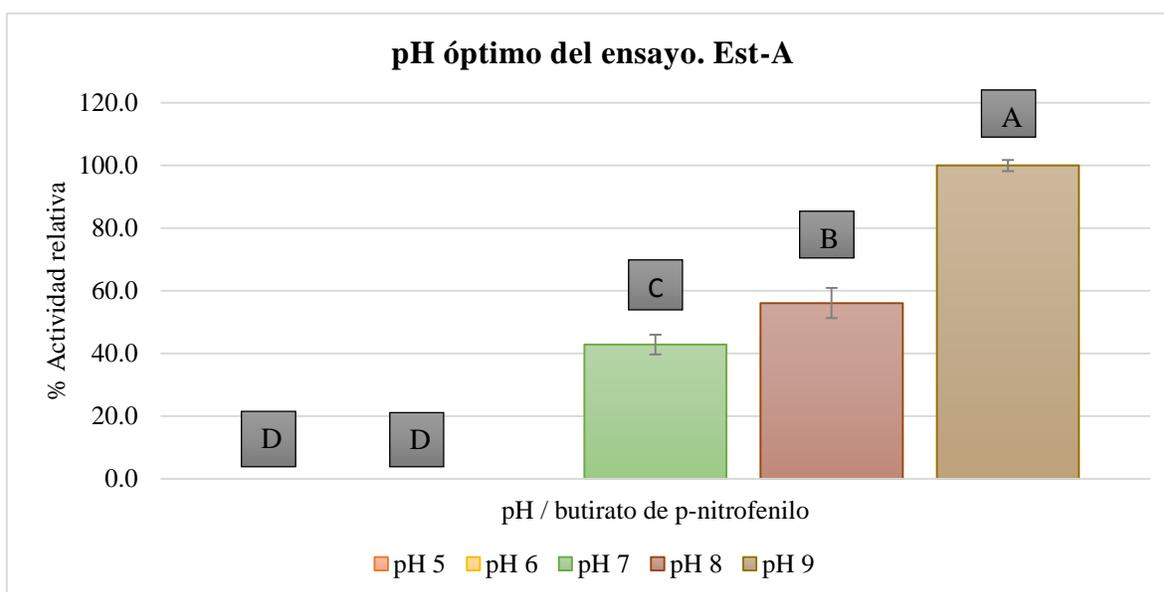


Figura 20. Efecto del pH en la actividad de carboxilesterasa de la clona Est-A. Frente a butirato de *p*-nitrofenilo, a temperatura ambiente y diferentes valores de pH.

7.5.1.3 DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA ÓPTIMA

Al observar los valores de actividad para obtener la especificidad por sustrato (7.5.1.1) y pH óptimo (7.5.1.2) se encontró que las enzimas de la fracción intracelular presentaban una baja estabilidad, entonces para los siguientes experimentos se utilizó una nueva preparación enzimática.

La determinación de temperatura óptima del ensayo para la fracción intracelular de la clona Est-A, se realizó empleando las condiciones idóneas de actividad, es decir, a pH 9 (pH óptimo del ensayo) y utilizando butirato de *p*-nitrofenilo (C₄) (sustrato óptimo del ensayo), variando las condiciones de temperatura del ensayo a 25°C, 30°C, 40°C y 50°C. Una vez cuantificado el producto de hidrólisis (*p*-nitrofenol) del sustrato utilizado, se graficaron los valores promedio de cada medición (**Anexo III – Figura 32**). Se determinó la actividad volumétrica “U/mL de fracción intracelular” (no presentado) y la actividad específica “U/mg de proteína” para determinar la temperatura óptima del ensayo (**Tabla 5**).

Tabla 5. Actividad específica y relativa de la fracción intracelular de la clona Est-A frente al sustrato butirato de *p*-nitrofenilo, a pH 9 y a distintos valores de temperatura. El ensayo se incubó por 20 min.

Temperatura / pH 9 / butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	Actividad Específica (U (μmol <i>p</i> -nitrofenol/min) / mg de proteína)	% Actividad relativa
25°C	$1.89 \times 10^{-3} \pm 6.28 \times 10^{-5}$	$57.9 \pm 1.9^{(B)}$
30°C	$2.04 \times 10^{-3} \pm 8.00 \times 10^{-5}$	$62.7 \pm 2.5^{(B)}$
40°C	$3.26 \times 10^{-3} \pm 1.55 \times 10^{-4}$	$100.0 \pm 4.8^{(A)}$
50°C	0.0 ± 0.0	$0.0 \pm 0.0^{(C)}$

Los valores mostrados son valores medios \pm desviación estándar, derivados de tres experimentos independientes. Una letra diferente indica diferencia estadísticamente significativa con α 0.05.

Al realizar un análisis estadístico (Anova) y un análisis por el método LSD de Fisher de los valores obtenidos de actividad específica a diferentes valores de temperatura (**Tabla 5**), mediante la implementación del Software Minitab 17.0.2, al 95 % de confianza para ambos casos (**Anexo III – Tablas 19 y 20**), la actividad específica a una temperatura de 40°C es estadísticamente diferente a las demás temperaturas evaluadas, siendo esta la temperatura óptima del ensayo.

En la **Figura 21** se presentan gráficamente los valores de % de actividad relativa (**Tabla 5**) y se observa que la clona Est-A presenta nula actividad a pH 9 con temperaturas mayores a 40°C, y presenta ~37.3 % más actividad a 40°C que en comparación con la obtenida a 30°C.

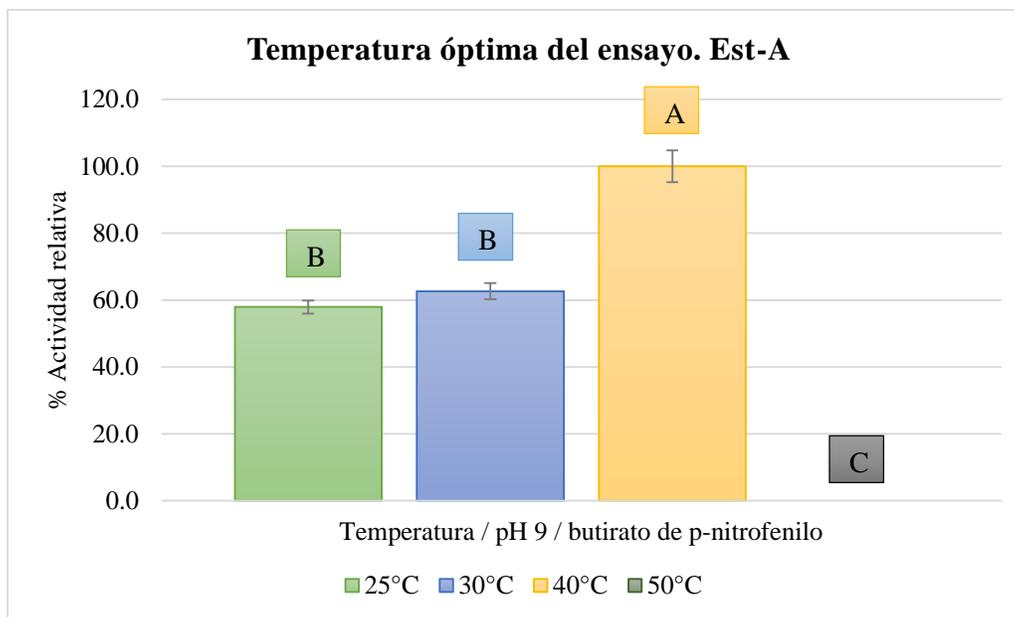


Figura 21. Efecto de la temperatura del ensayo para la clona Est-A frente a butirato de *p*-nitrofenilo, a pH 9 y diferentes condiciones de temperatura.

7.5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA PREPARACIÓN ENZIMÁTICA CRUDA DE LA CLONA **Est-C**

7.5.2.1 DETERMINACIÓN DE ESPECIFICIDAD POR SUSTRATOS

Para la caracterización bioquímica de la fracción intracelular de la clona Est-C, se realizó la determinación de especificidad por sustrato, mediante la medición del producto de hidrólisis (*p*-nitrofenol) del enlace éster de cada sustrato evaluado. Se utilizaron ésteres de *p*-nitrofenilo con grupos acilo de cadena corta (C₂ - C₈) y de cadena larga (C₁₀ - C₁₆) a una concentración final de 0.1 mM, a pH 7 y temperatura ambiente. Se determinó la actividad volumétrica “U/mL de fracción intracelular” (no presentado) y la actividad específica “U/mg de proteína” para determinar el sustrato óptimo del ensayo (**Tabla 6**); las unidades de actividad “U”, se representan como μmol de *p*-nitrofenol liberado por min.

Tabla 6. Actividad específica y relativa de la fracción intracelular de la clona Est-C frente a diversos sustratos (ésteres de *p*-nitrofenilo), a temperatura ambiente y pH 7.

Sustrato a pH 7	Actividad Específica (U ($\mu\text{mol } p\text{-nitrofenol/min}$) / mg de proteína)	% Actividad relativa
Acetato de <i>p</i> -nitrofenilo	$4.49 \times 10^{-4} \pm 2.18 \times 10^{-5}$	$85.1 \pm 4.1^{(B)}$
Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	$5.28 \times 10^{-4} \pm 1.24 \times 10^{-5}$	$100.0 \pm 2.4^{(A)}$
Octanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	$4.06 \times 10^{-4} \pm 1.56 \times 10^{-5}$	$76.9 \pm 3.0^{(C)}$
Decanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	$2.21 \times 10^{-4} \pm 3.19 \times 10^{-5}$	$42.0 \pm 6.0^{(D)}$
Dodecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	$7.66 \times 10^{-5} \pm 3.06 \times 10^{-5}$	$14.5 \pm 5.8^{(E)}$
Hexadecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	$2.69 \times 10^{-5} \pm 2.18 \times 10^{-5}$	$5.1 \pm 4.1^{(F)}$

Los valores mostrados son valores medios \pm desviación estándar, derivados de tres experimentos independientes. Una letra diferente indica diferencia estadísticamente significativa con α 0.05.

En la **Tabla 6**, se muestra la mayor actividad enzimática para la clona Est-C con un valor de $5.28 \times 10^{-4} \pm 1.24 \times 10^{-5}$ U/mg de proteína. Al realizar el análisis estadístico Anova y LSD (**Anexo IV – Tabla 23 y 24**) con el Software Minitab 17.0.2, se encontró que la actividad enzimática frente al sustrato butirato de *p*-nitrofenilo es estadísticamente diferente a las demás determinaciones, por lo cual dicho sustrato es considerado el óptimo del ensayo.

En la **Figura 22** se presenta gráficamente los valores de % de actividad relativa (**Tabla 6**), considerando que el 100 % corresponde al valor numérico más alto de actividad específica. El comportamiento observado corresponde a una actividad enzimática de tipo carboxilesterasa, debido a que presenta preferencia frente a sustratos con grupos acilo de cadena corta ($\leq C_8$) con actividades superiores al 70 % que en comparación con sustratos con grupos acilo de cadena larga ($\geq C_{10}$) con actividades menores 50 %.

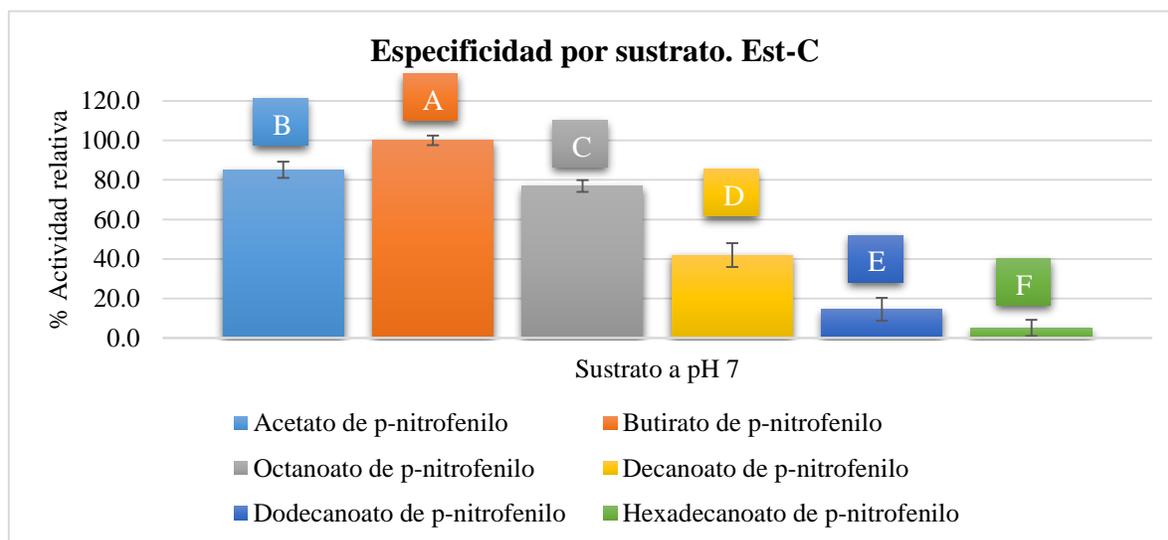


Figura 22. Especificidad por sustrato para la clona Est-C, a temperatura ambiente y pH 7.

7.5.2.2 DETERMINACIÓN DE pH ÓPTIMO

La determinación de pH óptimo del ensayo para la fracción intracelular de la clona Est-C, se utilizó el sustrato óptimo (butirato de *p*-nitrofenilo (C₄)) a una concentración final de 0.1 mM, a temperatura ambiente, en un rango de pH de ensayo de pH 5 a pH 9. Los valores obtenidos se graficaron (Anexo IV- Figura 34) y se procedió a determinar la actividad volumétrica (no mostrada) y la actividad específica (Tabla 7).

A pH 9 se tiene la mayor actividad específica con un valor de $4.15 \times 10^{-4} \pm 1.36 \times 10^{-6}$ U/mg de proteína (Tabla 7), dicho valor es estadísticamente diferente a valores de pH menores de 8 (Anexo IV – Tabla 27 y 28) a un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 7. Actividad específica y relativa de la fracción intracelular de la clona Est-C frente al sustrato butirato de *p*-nitrofenilo, a temperatura ambiente, a diversos valores de pH.

pH / butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	Actividad Específica (U (μmol <i>p</i> -nitrofenol/min) / mg de proteína)	% Actividad relativa
pH 5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 ^(D)
pH 6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 ^(D)
pH 7	$2.07 \times 10^{-4} \pm 3.59 \times 10^{-6}$	49.9 ± 0.9 ^(C)
pH 8	$2.68 \times 10^{-4} \pm 7.88 \times 10^{-6}$	64.6 ± 1.9 ^(B)
pH 9	$4.15 \times 10^{-4} \pm 1.36 \times 10^{-6}$	100.0 ± 0.3 ^(A)

Los valores mostrados son valores medios ± desviación estándar, derivados de tres experimentos independientes. Una letra diferente indica diferencia estadísticamente significativa con α 0.05.

En la Figura 23, se observa gráficamente que a pH 9 presenta la actividad óptima del ensayo frente a butirato de *p*-nitrofenilo. Se presenta una disminución de ~30 % de actividad a pH 8 y del 100 % a pH ácidos (en los cuales las proteínas tendían a precipitar y por consiguiente a perder su actividad).

Se esperaría que la actividad específica en las determinaciones a pH 7 frente a butirato de *p*-nitrofenilo fuera similar entre lo reportado en la Tabla 6 ($5.28 \times 10^{-4} \pm 1.24 \times 10^{-5}$ U/mg de proteína,) y Tabla 7 ($2.07 \times 10^{-4} \pm 3.59 \times 10^{-6}$ U/mg de proteína), debido a que al realizar ambas determinaciones se utilizaron las mismas preparaciones, probablemente exista una pérdida de estabilidad de la enzima por el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, este efecto es similar a lo observado en la clona Est-A, en donde existe una disminución de ~0.00032 U/mg de proteína entre cada determinación para ambos casos.

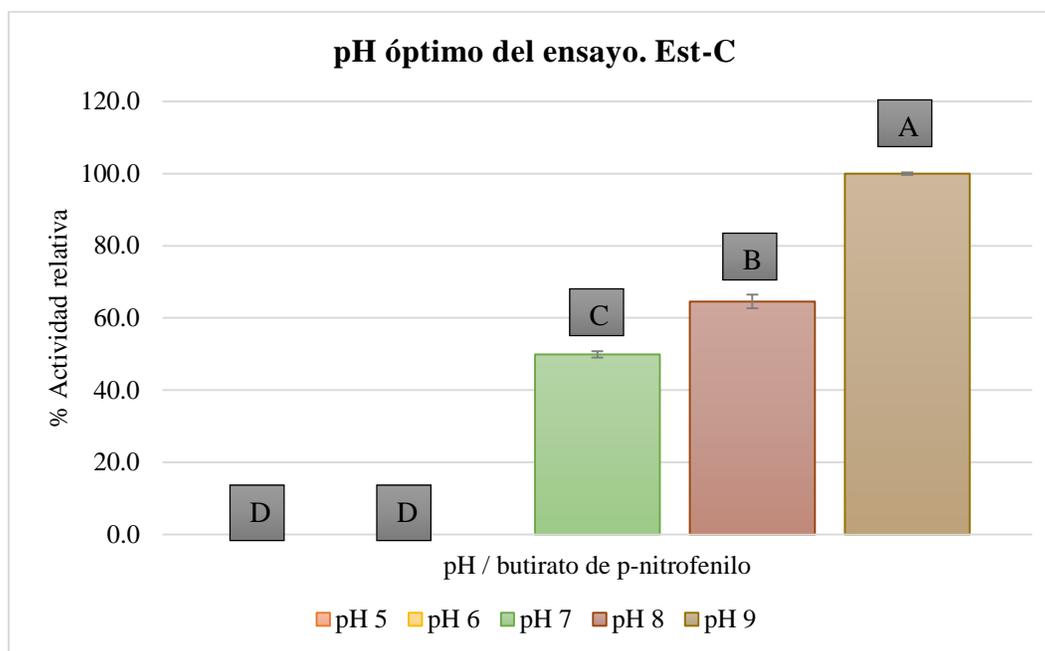


Figura 23. Efecto del pH en la actividad carboxilesterasa de la clona Est-C. Frente a butirato de *p*-nitrofenilo, a temperatura ambiente y diferentes valores de pH.

7.5.2.3 DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA ÓPTIMA

Debido a la disminución de la actividad enzimática observada entre las determinaciones de especificidad por sustrato y pH óptimo, se utilizó una preparación enzimática fresca para esta determinación, empleando las condiciones óptimas de sustrato y pH, es decir, a pH 9 y el sustrato butirato de *p*-nitrofenilo (C₄), variando las condiciones de temperatura del ensayo a 25°C, 30°C, 40°C y 50°C. Se determinó la actividad volumétrica “U/mL de fracción intracelular” (no presentado) y la actividad específica “U/mg de proteína” (Tabla 8).

Tabla 8. Actividad específica y relativa de la fracción intracelular de la clona Est-C frente al sustrato butirato de *p*-nitrofenilo, a pH 9 y a distintos valores de temperatura. El ensayo se incubó por 10 min.

Temperatura / pH 9 / butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	Actividad Específica (U (μmol <i>p</i> -nitrofenol/min) / mg de proteína)	% Actividad relativa
25°C	$1.89 \times 10^{-3} \pm 1.13 \times 10^{-4}$	$73.8 \pm 4.4^{(C)}$
30°C	$2.12 \times 10^{-3} \pm 1.65 \times 10^{-4}$	$82.9 \pm 6.5^{(B)}$
40°C	$2.56 \times 10^{-3} \pm 1.34 \times 10^{-4}$	$100.0 \pm 5.3^{(A)}$
50°C	0.0 ± 0.0	$0.0 \pm 0.0^{(D)}$

Los valores mostrados son valores medios \pm desviación estándar, derivados de tres experimentos independientes. Una letra diferente indica diferencia estadísticamente significativa con α 0.05.

Al realizar el análisis estadístico Anova y LSD (Anexo IV – Tabla 31 y 32) con el Software Minitab 17.0.2, se tiene que a temperatura de 40°C presenta una actividad específica de $2.56 \times 10^{-3} \pm 1.34 \times 10^{-4}$ U/mg de proteína (Tabla 8) que es estadísticamente diferente a los demás tratamientos analizados. Por lo cual, 40°C es la temperatura óptima del ensayo para la fracción intracelular de la clona Est-C.

En la Figura 24 se presentan gráficamente los valores de % de actividad relativa (Tabla 8) y se observa que la clona Est-C, presenta nula actividad carboxilesterasa a pH 9 con temperaturas mayores a 40°C, y presenta ~26 % más actividad a 40°C que a temperatura de 25°C.

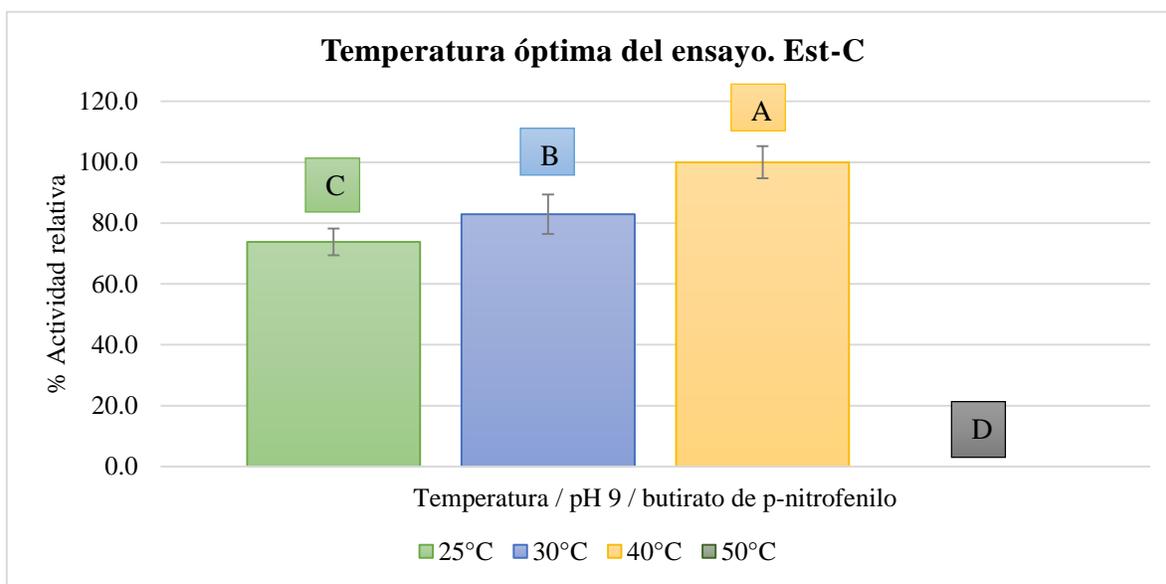


Figura 24. Efecto de la temperatura del ensayo para la clona Est-C frente a butirato de *p*-nitrofenilo, a pH 9 y diferentes condiciones de temperatura.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La determinación de la especificidad de la enzima por sustratos es importante debido a que direcciona el posible enfoque de aplicación industrial de las esterasas. Tanto la clona Est-A como la clona Est-C, presentan una mayor actividad carboxilesterasa (C₂-C₈) que de

triacilglicerol lipasa (C₁₀-C₁₆), concordando con los resultados obtenidos en la **Figura 12 y 13** y en conjunto con la caracterización realizada, se puede decir, que las enzimas en estudio no pueden hidrolizar sustrato insolubles en agua (acetite de olivo) y no presentan una aparente activación interfacial (tapa), teniendo un comportamiento de tipo carboxilesterasa (Bornscheuer, 2002). Este tipo de especificidad de sustrato y tipo de actividad alta frente a sustratos de cadena corta (C₂-C₈) y ligera actividad frente a sustratos con cadena larga (C₁₀-C₁₆) coincide con el comportamiento reportado para otras carboxilesterasas obtenidas de distintas bibliotecas metagenómicas como EstEP16 (acetato de *p*-nitrofenilo como sustrato (C₂)) (Zhu *et. al.*, 2013), Est-gela (Kim *et. al.*, 2015), EstWSD (Wang *et. al.*, 2013) y est2K (Kim *et. al.*, 2010) (Estas últimas enzimas presentan una actividad óptima frente a butirato *p*-nitrofenilo (C₄)). EstA3 enzima proveniente de *Thermoanaerobacter tengcongenensis* presenta una actividad alta frente a hexanoato de *p*-nitrofenilo (C₆) (Rao *et. al.*, 2011) y RmEstB enzima proveniente de *Rhizomucor miehei* frente a acetato de *p*-nitrofenilo (C₂) (Yan *et. al.*, 2014).

En las determinaciones de pH y temperatura óptima del ensayo evaluadas para las fracciones intracelulares crudas de cada clona, se observa un comportamiento similar teniendo un pH óptimo de 9 y temperaturas óptimas de 40°C en ambos casos. Este comportamiento se asemeja al pH y temperatura óptima de la carboxilesterasa ESTG34 obtenida de una biblioteca metagenómica de composta termofílica, el cual es de pH 9 y 41°C (Ohlhoff *et. al.*, 2015).

La mayoría de las carboxilesterasas de origen bacteriano presentan un pH óptimo entre 8 - 10 como ocurre con *Thermoanaerobacter tengcongenensis* (Rao *et. al.*, 2011), *Bacillus subtilis* DR8806 (Asoodeh y Ghanbari, 2013), *Bacillus gelatini* (Kim *et. al.*, 2015) y algunas provenientes de distintas bibliotecas metagenómicas como EstEp16 (Zhu *et. al.*, 2013), EstEH112 (Oh *et. al.*, 2012), Est-A2, Est-B1 (Leis *et. al.*, 2015), est01 (Cheng *et. al.*, 2014) entre otras. La temperatura óptima de carboxilesterasas que han sido reportadas está en un rango de 20°C - 50°C (Ohlhoff *et. al.*, 2015).

Al presentar ambas enzimas en estudio, las condiciones óptimas antes mencionadas, se podrían aplicar en formulaciones de detergentes, debido a que se requieren enzimas activas y estables en medios alcalinos (pH 8 – 11) y a temperaturas elevadas que son encontradas

en el ambiente de lavado (Borrelli y Trono, 2015). También se pueden aplicar en la producción *in situ* de emulsificantes en la industria de panificación como son: Diacilgliceroles (DAG) y Monoacilgliceroles (MAG); así como en la industria láctea, utilizadas para la hidrólisis de lípidos (en ácidos grasos de cadena corta) durante el proceso de maduración de distintas variedades de quesos.

En análisis anteriores, Torres (2016), realizó la secuenciación de los insertos de las clonas Est-A y Est-C mediante el método de Primer Walking, y encontró para la clona Est-A, dos proteínas, ferredoxina (368 aa) y Oxidoreductasa (266 aa) con identidades del 99 % para ambas y probablemente proveniente de *Propionibacterium acidipropionici* en ambos casos. Para la clona Est-C se encontró una oxidoreductasa hipotética (306 aa) probable proveniente del microorganismo *Bifidobacterium psychraerophilum* con un 73 % de identidad y una proteína de la familia de las integrasas (405 aa) proveniente de *Propionibacterium acidipropionici* con un 100 % de identidad. Dichas proteínas provienen de microorganismos que han sido identificados del metagenoma del queso Cotija. Con lo anteriormente expuesto, se podría tratar en ambos casos de enzimas con doble actividad (actividad promiscua), las cuales reconocerían el enlace éster de los sustratos de este estudio.

En investigaciones realizadas por otros grupos de investigación, se observa que al realizar un análisis de las clonas de una biblioteca metagenómica obtenida a partir de la microbiota de rumen bovino, para la detección de actividad esterasa (frente a ésteres de *p*-nitrofenilo), los insertos de las clonas positivas (11) a dicha actividad, se analizaron y dos clonas no presentaban homología con hidrolasas y correspondían a proteínas hipotéticas (Ferrer *et. al.*, 2005). En el 2007, se analizó una biblioteca metagenómica de suelos y composta, en la cual se realizó un escaneo en busca de actividad lipolítica (con tributirina y ésteres de *p*-nitrofenilo como sustratos), encontrando 14 clonas positivas, de las cuales al analizar los insertos de cada una, se encontraron 3 clonas que no presentaban similitud con algún tipo de esterasa (clona KL05-proteína hipotética, clona KL07-proteína hipotética y clona KL11-Amidasa, probable Enoyl-CoA-hidratasa/isomerasa) pero que presentaban actividad frente a butirato de *p*-nitrofenilo principalmente (Lammle *et. al.*, 2007).

La posibilidad de encontrar esterases “verdaderas” mediante el escaneo de una biblioteca metagenómica en busca de actividad lipolítica es baja. Algunos autores han reportado el análisis de miles de clonas en búsqueda de actividad lipolítica y la posibilidad de encontrar una clona positiva es baja, como en el caso de una biblioteca a partir de: biogás con 1 positiva de 9,600 clonas analizadas (Cheng *et. al.*, 2014), composta y suelos con 14 positivas de 21,000 clonas (Lammle *et. al.*, 2007), composta fermentada con 19 positivas de 23,400 clonas (Kim *et. al.*, 2010), suelo con 19 positivas de 48,000 clonas (Wang *et. al.*, 2013), composta con 25 positivas de 110,592 clonas analizadas (Ohlhoff *et. al.*, 2015), agua de estanque 1 positiva de 2,727 clonas (Ranjan *et. al.*, 2005; Steele *et. al.*, 2009), y 13 positivas de 100,000 clonas analizadas provenientes de queso Cotija (Torres, 2016) las cuales algunas pertenecen a las clonas tratadas en el presente trabajo, entre otras. Poniendo de manifiesto que se deberían probar más clonas para encontrar la actividad enzimática de interés.

9. CONCLUSIONES

- La actividad enzimática de las clonas Est-A y Est-C es de tipo carboxilesterasa.
- Se observó cualitativamente una mayor actividad enzimática en la fracción intracelular que en la fracción extracelular de cada clona evaluada.
- El perfil electroforético y la actividad esterasa revelada por zimografía fue muy similar para ambas clonas, ya que presentaron proteínas con dicha actividad de 45, 38, 35 y 28 KDa.
- Las preparaciones enzimáticas intracelulares crudas para ambas clonas, presentaron características bioquímicas similares, ya que tuvieron una mayor especificidad por sustratos con grupos acilo de cadena corta (butirato de *p*-nitrofenilo (C₄)), pH óptimo de 9 y una temperatura óptima de 40°C.

10. PERSPECTIVAS

- Establecer una técnica de purificación adecuada para las enzimas de las clonas evaluadas.
- Identificación de las proteínas puras con actividad enzimática para cada clona evaluada.
- Evaluar bioquímicamente la actividad enzimática de la enzima pura y realizar la comparación contra los resultados obtenidos en este proyecto.
- Realizar pruebas de estabilidad para posible aplicación biotecnológica.

11. BIBLIOGRAFÍA

Adrio, J.L. y Demain A.L. (2014). Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules*, 4, 117-139.

Alcántara, M. (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, Asociación Regional de Productores de queso Cotija, CIATEJ, El Colegio de Michoacán, Cotija de la Paz, Michoacán, México.

Asoodeh, A. y Ghanbari, T. (2013). Characterization of an extracellular thermophilic alkaline esterase produced by *Bacillus subtilis* DR8806. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 85– 86, 49– 55.

Aurilia, V., Parracino, A., D’Auria, S. (2008). Microbial carbohydrate esterases in cold adapted environments. *Gene*, 410, 234–240.

Badui, S. (2013). Leche **En**: S. Badui eds. *Química de los Alimentos*. México: Pearson, 12.

Beilen, J.B. y Li, Z. (2002). Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 338-344.

Belitz, H.-D. y Grosch, W. (1997). Leche y productos lácteos **En**: H.-D. Belitz y W. Grosch eds. *Química de los alimentos*. España: ACRIBIA, S.A., 10.

Biorad Laboratories. (2014). Image Lab 5.2.1 build 11. Estados Unidos de América.

Bornscheuer, U.T. (2002). Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 73-81.

Bornscheuer, U.T., Bessler, C., Srinivas, R., Hari, Krishna, S. (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology*, 20(10), 433-437.

Bornscheuer, U.T. y Kazlauskas, R.J. (1999). Hydrolases in organic synthesis -regio- and stereoselective biotransformations. *Wiley- VCH, Weinheim*.

Borrelli, G.M. y Trono, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 20774 – 20840.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.

- Cheng, X., Wang, X., Qiu, T., Yuan, M., Sun, J. y Gao, J. (2014). Molecular Cloning and Characterization of a Novel Cold-Adapted Family VIII Esterase from a Biogas Slurry Metagenomic Library. *J. Microbiol. Biotechnol*, 24 (11), 1484-1489.
- Chow, J., Kovacic, F., Dall Antonia, Y., Krauss, U., Fersini, F., et. al. (2012). The Metagenome-Derived Enzymes LipS and LipT Increase the Diversity of Known Lipases. *PLoS ONE*, 7(10), e47665.
- Demain, A.L. y Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*, 27, 297-306.
- Devirgillis, C., Zinno, P., Stirpe, M., Barile, S., y Perozzi, G. (2014). Functional screening of antibiotic resistance genes from a representative metagenomic library of food fermenting microbiota. *BioMed Research International*, 2014, 1-9.
- Escobar, A. (2012). “Estudio de la distribución espacial de la microbiota bacteriana en queso Cotija por la técnica de Fish”. Tesis de Maestría. *Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas*. UNAM.
- Ferrer, M., Belouqui, A., Timmis, K.N., y Golyshin, P.N. (2009). Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 16, 109–123.
- Ferrer, M., Golyshina, O.V., Chernikova, N.T., Khachane, A.N., Duarte, D.R., Martins, Dos Santos, V.A., Kieran Elborough, C.S., Jarvis, G., Neef, A., Yakimov, M., Timmis, K., y Golyshin, P. (2005). Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environmental Microbiology*, 7(12), 1996–2010.
- Fojan, P., Jonson, P., Petersen, M., Petersen, S. (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie*, 82 (2000), 1033–1041.
- García, V. (2006). “Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso Cotija”. Tesis de licenciatura. *Facultad de química*. UNAM.
- García, 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.
- Guazzaroni, M.E., Silva-Rocha, R. y Ward, R.J. (2014). Synthetic biology approaches to improve biocatalyst identification in metagenomic library screening. *Microbial Biotechnology*, 8(1), 52–64.
- Hasan, F., Ali Shah, A., Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 235-251.
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol*, 68(4), 669-685.

Handelsman, J., Rondon, MR., 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. *Chem Biol*, 5, 245–9.

Hernández, V. (2007). “Queso Cotija: Estudio del análisis fisicoquímico, proximal y actividad antioxidante”. Tesis de licenciatura. *Facultad de química*. UNAM.

International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 2015.

[En línea] (Actualizado al día 21 de Agosto del 2015).

Disponible en:

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/> [Último acceso el 10 de noviembre del 2015].

Jaeger, K.E. y Egger, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 13(4), 390-7.

Kim, J., Deng, L., Hong, E., Ryu, Y. (2015). Cloning and characterization of a novel thermostable esterase from *Bacillus gelatini* KACC 12197. *Protein Expression and Purification*, 116, 90-97.

Kim, Y.H., Kwon, E.J., Kim, S.K., Jeong, Y.S., Kim, J., Yun, H.D., Kim, H. (2010). Molecular cloning and characterization of a novel family VIII alkaline esterase from a compost metagenomic library. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393, 45–49.

Lammle, K., Zipper, H., Breuer, M., Hauer, B., Buta, C., Brunner, H., Rupp, S. (2007). Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. *Journal of Biotechnology*, 127, 575-592.

Leis, B., Angelov A., Mientus, M., Li, H., Pham, V., Lauinger, B., Bongen, P., Pietruszka J., Gonçalves, L., Santos, H., y Liebl, W. (2015). Identification of novel esterase-active enzymes from hot environments by use of the host bacterium *Thermus thermophilus*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 275.

Lescic, I., Ivic´, N., Kovacic, F., Schell, S., Knorr, J., Krauss, U., Wilhelm, S., Kojic-Prodic, B. y Jaeger, K.E. (2010). Probing Enzyme Promiscuity of SGNH Hydrolases. *ChemBioChem*, 11, 2158-2167.

Lescic, I., Vukelic, B., Majeric´-Elenkov, M., Saenger, W., Abramic M. (2001). Substrate specificity and effects of water-miscible solvents on the activity and stability of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 548–553.

Linko, Y.Y., Lamsa, M., Wu, X., Uosukainen, E., Seppala, J., Linko, P. (1998). Biodegradable products by lipase biocatalysis. *J. Biotechnol*, 66(1), 41–50.

Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F., Eck, J. (2002). Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr Opin Biotechnol*, 13, 572–7.

Miller, R., y Karn, R. (1980). A rapid spectrophotometric method for the determination of esterase activity. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 3, 345-354.

Minitab. (2013). Minitab 17.0.2. Estados Unidos de América.

NMX-F-735-COFOCALEC-2011. Sistema producto leche – Alimentos - Lácteos - Alimento lácteo regional - Queso Cotija artesanal madurado - Denominación, especificaciones y métodos de prueba.

Oh, K.H., Nguyen, G.S., Kim, E.Y., Kourist, R., Bornscheuer, U., Oh, T.K., Yoon, J.H. (2012). Characterization of a novel esterase isolated from intertidal flat metagenome and its tertiary alcohols synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 80, 67– 73.

Ohlhoff, C.W., Kirby, B.M., Van Zyl, L., Mutepfa, D., Casanueva, A., Huddy, R., Bauer, R., Cowan, D., Tuffin, M. (2015). An unusual feruloyl esterase belonging to family VIII esterases and displaying a broad substrate range. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 118, 79–88.

Ollis, D.L. *et al.* (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Eng*, 5, 197-211.

Peña, C. (1998). “Obtención de mutantes alteradas en el metabolismo de lípidos en *Aspergillus nidulans*”. Tesis de licenciatura. *Facultad de química*. UNAM.

Peña, C. (2001). “Producción, purificación y caracterización bioquímica de una enzima con actividad lipolítica en *Aspergillus nidulans*”. Tesis de maestría. *Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas*. UNAM.

Peña, C. (2009). “Análisis de la expresión y caracterización de la esterasa StcI involucrada en la biosíntesis de enterigmatocistina”. Tesis de doctorado. *Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas*. UNAM.

Peña, C. y Quirasco, M. (2014). ¿Enzimas en los alimentos? Bioquímica de lo comestible. *Revista digital universitaria*, 15(12), ISSN 1607-6079.

Disponible en:

<http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art94/>

Pereira de Castro, A., Quirino, B.F., Allen, H., Williamson, L.L., Handelsman, J., Kruger, R.H. (2011). Construction and validation of two metagenomic DNA libraries from Cerrado soil with high clay content. *Biotechnol Lett*, 33, 2169-2175.

Quirasco, M. y Lopez, A. (2013). Enzimas. **En:** *Química de los Alimentos*. Badui, S. México: Pearson, 5.

- Ranjan, R., Grover, A., Kapardar, R.K., Sharma, R. (2005). Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. *Biochem Biophys Res Commun*, 335, 57–65.
- Rao, L., Xue, Y., Zhou, C., Tao, J., Li, G., Lu, J.R., Ma, Y. (2011). A thermostable esterase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* opening up a new family of bacterial lipolytic enzymes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814, 1695–1702.
- Reetz, M.T. (2002). Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6, 145-150.
- Robles, T. (2014). “Identificación molecular de microorganismos aislados del queso Cotija y de sus materias primas”. Tesis de licenciatura. *Facultad de química*. UNAM.
- Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., *et al.* (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 66, 2541–2547.
- Salazar, A.M., Sandoval, A.S., Armendáriz, J.S. (2013). Vectores de clonación y expresión **En:** A.S., Sandoval, E., Mena, A.L., Márquez eds. *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. México: Mc Graw Hill, 14.
- Schmid, R.D. y Verger, R. (1998). Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37, 1608–1633.
- Schloss, P. y Handelsman, J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 303-310.
- Simon, C., Herath, J., Rockstroh, S., Daniel, R. (2009). Rapid identification of genes encoding DNA polymerases by function-based screening of metagenomic libraries derived from glacial ice. *Appl Environ Microbiol*, 75, 2964-2968.
- Sriyapai, P., Kawai, F., Siripoke, S., Chansiri, K. y Sriyapai, T. (2015). Cloning, Expression and Characterization of a Thermostable Esterase HydS14 from *Actinomadura sp.* Strain S14 in *Pichia pastoris*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 13579 – 13594.
- Steele, H.L., Jaeger, K.E., Daniel, R., Streit, W.R. (2009). Advances in Recovery of Novel Biocatalysts from Metagenomes. *J. Mol. Microbiol Biotecnol*, 16, 25-37.
- Streit, W.R y Daniel, R. (2010). Molecular Methods to Study Complex Microbial Communities **En:** J.M., Vieites, M., Guazzaroni, A., Beloqui, P.N., Golyshin, and M., Ferrer eds. *Metagenomics. Methods and Protocols*. UK: Humana Press, 1.
- Streit, W.R y Daniel, R. (2010-b). Molecular Methods to Study Complex Microbial Communities **En:** N., Weiland, C., Löscher, R., Metzger, and R. Schmitz eds. *Metagenomics. Methods and Protocols*. UK: Humana Press, 3.

- Streit, W.R. y Schmitz, R.A. (2004). Metagenomics – the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol*, 7 (5), 492-8.
- Tielen, P., Kuhn, H., Rosenau, F., Jaeger, K. E., Flemming, H.C., y Wingender, J. (2013). Interaction between extracellular lipase LipA and the polysaccharide alginate of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology*. 13, 159.
- Torres, I. (2016). “Elaboración de un banco metagenómico del queso Cotija e identificación funcional de esterasas”. Tesis de Maestría. *Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas*. UNAM.
- Uchiyama, T., y Miyazaki, K. (2009). Functional metagenomics for enzyme Discovery; challenges to efficient screening. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 616-622.
- Van Der Walle, N., Uber. (1927). Enzyme bei bakterien und Schimmelpilzen. *Cbi Bakt Parasintek Infektionskr*, 70, 369-73.
- Verger, R. (1997). ‘Interfacial activation’ of lipases: Facts and artefacts. *Trends Biotechnol*, 15, 32–38.
- Walstra, P. y Oria, R. (1991). Queso **En**: R. Dumais, J.A. Blais, y F. Conrad. eds. *Ciencia y tecnología de la leche. Principios y aplicaciones. España: ACRIBIA, S.A., IX*.
- Wang, S., Wang, K., Li, L., Liu, Y. (2013). Isolation and characterization of a novel organic solvent-tolerant and halotolerant esterase from a soil metagenomic library. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 95, 1-8.
- Wei, Y., Schottel, J.L., Derewenda, U., Swenson, L., Patkar, S. y Derewenda, Z.S. (1995). A novel variant of the catalytic triad in the *Streptomyces scabies* esterase. *Nat. Struct. Biol*, 2, 218-223.
- Wiseman, A. (1995). Introduction to principles. **En**: Wiseman, A. eds. *Handbook of enzyme biotechnology*. UK: Ellis Horwood Ltd. T.J. Press Ltd. 3-8.
- Yan, Q.J., Yang, S.Q., Duan, X.J., Xu, H.B., Liu, Y., Jiang, Z.Q. (2014). Characterization of a novel hormone-sensitive lipase family esterase from *Rhizomucor miehei* with tertiary alcohol hydrolysis activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 109, 76–84.
- Zhu, Y., Li, J., Cai, H., Ni, H., Xiao, A., Hou, L. (2013). Characterization of a new and thermostable esterase from a metagenomic library. *Microbiological research*, 168, 589-597.

ANEXOS

ANEXO I

1. MEDIOS DE CULTIVO

1.1 Medio caldo Luria-Bernati (LB) con kanamicina. Medio para el crecimiento de las clonas esterasa positivas aisladas de la biblioteca metagenómica del queso Cotija.

Formulación	Para 100 mL de medio.
Bacto-triptona (BD)	1.0 g
NaCl (J.T. Baker)	1.0 g
Extracto de levadura (BD)	0.5 g
Agua desionizada completar hasta	100 mL
Ajustar a pH 7.5	
50 mg/mL de kanamicina (estéril) (Sigma)	100 µL

Elaboración:

1. Agregar bacto-triptona, NaCl y extracto de levadura, disolverlos en agua desionizada. Ajustar a pH 7.5 .
2. Esterilizar en autoclave (121°C / 15 min).
3. Dejar enfriar a 55°C, adicionar kanamicina y homogeneizar.

1.2 Medio caldo LB con glicerol y kanamicina. Medio para la conservación y almacenamiento de las clonas esterasa positivas aisladas de la biblioteca metagenómica de queso Cotija.

Formulación	Para 100 mL de medio.
Bacto-triptona (BD)	1.0 g
NaCl (J.T. Baker)	1.0 g
Extracto de levadura (BD)	0.5 g
Agua desionizada completar hasta	100 mL
Ajustar a pH 7.5	
Glicerol (estéril) (Sigma)	20 mL
50 mg/mL de kanamicina (estéril) (Sigma)	100 µL

Elaboración:

1. Agregar bacto-triptona, NaCl y extracto de levadura, disolverlos en agua desionizada. Ajustar a pH 7.5 .
2. Esterilizar en autoclave (121°C / 15 min).
3. Adicionar glicerol estéril y disolver en el medio LB.
4. Dejar enfriar a 55°C, adicionar kanamicina y homogeneizar.

1.3 Medio sólido LB con tributirina, kanamicina e isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Medio para la expresión enzimática carboxilesterasa de clonas esterasa positivas aisladas de la biblioteca metagenómica del queso Cotija.

Formulación	Para 100 mL de medio.
Bacto-triptona (BD)	1.0 g
NaCl (J.T. Baker)	1.0 g
Extracto de levadura (BD)	0.5 g
Agua desionizada completar hasta	100 mL
Tributirina (Sigma)	1 mL
Ajustar a pH 7.5	
Agar (BD)	1.5 g
50 mg/mL de kanamicina (estéril) (Sigma)	100 μ L
IPTG 100mM (estéril) (Sigma)	400 μ L

Elaboración:

1. Agregar bacto-triptona, NaCl y extracto de levadura y disolverlos en agua desionizada. Ajustar a pH 7.5 .
2. Adicionar tributirina y emulsificar con Ultraturax T25 a velocidad mínima de 2 a 3 minutos.
3. Adicionar agar, disolver y esterilizar en autoclave (121°C / 15 min).
4. Dejar enfriar a 55°C, adicionar kanamicina e IPTG (estériles) y mezclar.
5. Verter el medio en cajas Petri.

1.4 Medio sólido LB con aceite de olivo, kanamicina e IPTG. Medio para la expresión enzimática triacilglicerol lipasa de clonas esterasa positivas aisladas de la biblioteca metagenómica del queso Cotija.

Formulación	Para 100 mL de medio.
Bacto-triptona (BD)	1.0 g
NaCl (J.T. Baker)	1.0 g
Extracto de levadura (BD)	0.5 g
Agua desionizada completar hasta	100 mL
Ajustar a pH 7.5	
Emulsión (O/W) de acetite de olivo al 20 % (v/v) estéril	5 mL
Agar (BD)	1.5 g
50 mg/mL de kanamicina (estéril) (Sigma)	100 μ L
IPTG 100mM (estéril) (Sigma)	400 μ L

Elaboración (continuación):

1. Agregar bacto-triptona, NaCl y extracto de levadura y disolverlos en agua desionizada. Ajustar a pH 7.5 .
2. Adicionar agar, disolver y esterilizar en autoclave (121°C / 15 min).
3. Adicionar emulsión de aceite de olivo previamente estéril.
4. Dejar enfriar a 55°C, adicionar kanamicina e IPTG y mezclar.
5. Verter el medio en cajas Petri.

1.5 Medio caldo LB con tetraciclina. Medio para el crecimiento del microorganismo hospedero (control negativo) de la biblioteca metagenómica del queso Cotija.

Formulación	Para 100 mL de medio.
Bacto-triptona (BD)	1.0 g
NaCl (J.T. Baker)	1.0 g
Extracto de levadura (BD)	0.5 g
Agua desionizada completar hasta	100 mL
Ajustar a pH 7.5	
5 mg/mL de tetraciclina (estéril) (Sigma)	250 µL

Elaboración:

1. Agregar bacto-triptona, NaCl y extracto de levadura, disolverlos en agua desionizada. Ajustar a pH 7.5 .
2. Esterilizar en autoclave (121°C / 15 min). Dejar enfriar a 55°C, adicionar tetraciclina y homogeneizar.

2. SOLUCIONES ESTANDAR

2.1 Emulsión (O/W) de aceite de olivo al 20 % (v/v). Solución que contiene el sustrato utilizado para realizar medio sólido LB con aceite de olivo, kanamicina e IPTG.

Formulación	Para 5 mL de preparación
Aceite de olivo (Sigma)	1 mL
Goma arábica (Sigma)	200 mg
Agua desionizada completar hasta	5 mL

Elaboración (continuación):

1. Disolver goma arábica en agua desionizada a 90°C.
2. Adicionar aceite de olivo y emulsificar con Ultraturax T25 a velocidad mínima de 2 a 3 minutos.
3. Dejar reposar la solución durante 20 min, a temperatura ambiente.
4. Esterilizar en autoclave (121°C / 15 min).

2.2 Buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5. Solución utilizada como amortiguador de pH.

Formulación	Para 100 mL de preparación
KH ₂ PO ₄ (J.T. Baker)	0.23 g
K ₂ HPO ₄ (J.T. Baker)	1.45 g
Agua desionizada y filtrada	100 mL

Elaboración:

1. Agregar KH₂PO₄ y K₂HPO₄, disolverlos en agua desionizada filtrada. Ajustar a pH 7.5 .
2. Esterilizar en autoclave (121°C / 15 min).
3. Almacenar a 4°C.

2.3 Solución de resuspensión. Solución utilizada para resuspender y solubilizar proteínas del contenido celular de las clonas esterasa positivas aisladas de la biblioteca metagenómica del queso Cotija.

Formulación	Para 100 mL de preparación
Glicerol (Sigma)	10 mL
EDTA (USBiological)	37.2 mg
NaCl (J.T. Baker)	1.75 g
Buffer de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.5, completar hasta	100 mL

Elaboración:

1. Pesar y disolver EDTA y NaCl en buffer de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.5.
2. Adicionar glicerol y homogeneizar.

2.4 Reactivo revelador R (Fast Red TR [1 mM]). Solución utilizada para la detección de la actividad esterasa.

Formulación	Para 10 mL de preparación
Fast Red TR (Sigma)	2.57 mg
Tritón X-100 (Sigma)	10 μ L
Buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5, completar hasta	10 mL

Elaboración:

1. Disolver Fast Red TR en buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5.
2. Adicionar y homogeneizar tritón X-100 .

2.5 Reactivo revelador B (Fast Blue RR [1 mM]). Solución utilizada para la detección de la actividad esterasa.

Formulación	Para 10 mL de preparación
Fast Blue RR (Sigma)	3.88 mg
Tritón X-100 (Sigma)	10 μ L
Buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5, completar hasta	10 mL

Elaboración:

1. Disolver Fast Blue RR en buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5.
2. Adicionar y homogeneizar tritón X-100 .

2.6 Buffer de acetatos 0.5 M, pH 5. Solución amortiguadora de pH utilizada en la caracterización bioquímica de las enzimas en estudio.

Formulación	Para 100 mL de preparación
Acetato de sodio (J.T. Baker)	4.09 g
Ácido acético glacial (J.T. Baker)	1.09 mL
Agua desionizada y filtrada completar hasta	100 mL

Elaboración (continuación):

1. Disolver el acetato de sodio en agua desionizada filtrada, posteriormente adicionar el ácido acético glacial. Ajustar a pH 5.
2. Esterilizar en autoclave (121°C / 15 min).
3. Almacenar a 4°C.

2.7 Buffer de fosfato de potasio 0.5 M, pH 6. Solución amortiguadora de pH utilizada en la caracterización bioquímica de las enzimas en estudio.

Formulación	Para 100 mL de preparación
KH ₂ PO ₄ (J.T. Baker)	5.85 g
K ₂ HPO ₄ (J.T. Baker)	1.22 g
Agua desionizada y filtrada	100 mL

Elaboración:

1. Agregar KH₂PO₄ y K₂HPO₄, disolverlos en agua desionizada filtrada. Ajustar a pH 6.
2. Esterilizar en autoclave (121°C / 15 min).
3. Almacenar a 4°C.

2.8 Buffer de fosfato de potasio 0.5 M, pH 7. Solución amortiguadora de pH utilizada en la caracterización bioquímica de las enzimas en estudio.

Formulación	Para 100 mL de preparación
KH ₂ PO ₄ (J.T. Baker)	2.59 g
K ₂ HPO ₄ (J.T. Baker)	5.23 g
Agua desionizada y filtrada	100 mL

Elaboración:

1. Agregar KH₂PO₄ y K₂HPO₄, disolverlos en agua desionizada filtrada. Ajustar a pH 7.
2. Esterilizar en autoclave (121°C / 15 min).
3. Almacenar a 4°C.

2.9 Buffer tris base 0.5 M, pH 8 o 9. Solución amortiguadora de pH utilizada en la caracterización bioquímica de las enzimas en estudio.

Formulación	Para 100 mL de preparación
Tris base (Biorad)	6.06 g
Agua desionizada y filtrada	100 mL

Elaboración:

1. Disolver tris base en agua desionizada filtrada y ajustar a pH 8 o 9 con HCl.
2. Esterilizar en autoclave (121°C / 15 min).
3. Almacenar a 4°C.

3. SUSTRATOS

3.1 Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) [100 mM]. Sustrato utilizado como inductor para la producción enzimática de las clonas esterasa positivas.

Formulación	Para 10 mL de preparación
IPTG (Sigma)	0.24 g
Agua grado biología molecular	10 mL

Elaboración:

1. Disolver IPTG en agua grado biología molecular.
2. Homogeneizar y esterilizar por filtración mediante la implementación de Millex con tamaño de poro de 0.22 μ m.
3. Realizar alícuotas y almacenar a -20°C.

3.2 Sustrato A (Acetato de α -naftilo [3 mM]). Solución que contiene el sustrato utilizado para la detección de actividad esterasa.

Formulación	Para 10 mL de preparación
Acetato de α -naftilo (Sigma)	5.59 mg
Acetona (J.T. Baker)	1.0 mL
Buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5, completar hasta	10 mL

Elaboración (continuación):

1. Disolver acetato de α -naftilo en acetona.
2. Adicionar buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5.
3. Homogeneizar.

3.3 *p*-nitrofenol grado espectrofotométrico [1 mM]. Reactivo utilizado para realizar la curva patrón.

Formulación	Para 1 mL de preparación
<i>p</i> -nitrofenol grado espectrofotométrico (Fluka)	0.14 mg
Alcohol absoluto (Analitic)	1 mL

Elaboración:

1. Disolver completamente *p*-nitrofenol grado espectrofotométrico en alcohol absoluto.

3.4 Ésteres de *p*-nitrofenilo [1 mM]: Sustratos utilizados para la caracterización bioquímica en término de sustrato óptimo del ensayo.

Formulación	Para 1 mL de cada preparación
Acetato de <i>p</i> -nitrofenilo (Sigma)	0.18 mg
Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo (Sigma)	0.21 mg
Octanoato de <i>p</i> -nitrofenilo (Sigma)	0.26 mg
Decanoato de <i>p</i> -nitrofenilo (Sigma)	0.29 mg
Dodecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo (Sigma)	0.32 mg
Hexadecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo (Sigma)	0.38 mg
Alcohol absoluto (Analitic) para cada uno	1 mL

Elaboración:

1. Disolver completamente cada uno de los ésteres de *p*-nitrofenilo en alcohol absoluto.
2. Almacenar cada reactivo a -20°C máximo 7 días.

4. REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS

4.1 Solución de acrilamida al 30 % (w/v). Solución soporte utilizada para realizar geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

Formulación	Para 100 mL de preparación
Acrilamida (Biorad)	29.2 g
N´N´-bis-metilen-acrilamida (Biorad)	0.8 g
Agua desionizada y filtrada	100 mL

Elaboración:

1. Agregar acrilamida y N´N´-bis-metilen-acrilamida, disolverlos en agua desionizada y filtrada.
2. Almacenar a 4°C, en condiciones de oscuridad.

4.2 SDS 10 % (w/v). Solución desnaturizante de proteínas utilizada para realizar geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

Formulación	Para 100 mL de preparación
SDS (Biorad)	10.0 g
Agua desionizada y filtrada	100 mL

Elaboración:

1. Disolver SDS en agua desionizada filtrada y caliente.
2. Almacenar a temperatura ambiente.

4.3 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8. Solución amortiguadora utilizada para realizar geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

Formulación	Para 100 mL de preparación
Tris base (Biorad)	18.15 g
Agua desionizada y filtrada	100 mL

Elaboración:

1. Disolver tris base en agua desionizada filtrada.
2. Ajustar a pH 8.8.
3. Almacenar a 4°C.

4.4 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8. Solución amortiguadora utilizada para realizar geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

Formulación	Para 100 mL de preparación
Tris base (Biorad)	6.0 g
Agua desionizada y filtrada	100 mL

Elaboración:

1. Disolver tris base en agua desionizada filtrada.
2. Ajustar a pH 6.8.
3. Almacenar a 4°C.

4.5 Azul de bromofenol 0.5 % (w/v). Solución utilizada para realizar buffer de carga desnaturalizante.

Formulación	Para 1 mL de preparación
Azul de bromofenol (Merck)	5 mg
Alcohol absoluto (Analytc) completar hasta	1 mL

Elaboración:

1. Disolver azul de bromofenol en alcohol absoluto.

4.6 Persulfato de amonio (APS) 10 % (w/v). Agente oxidante utilizado para realizar geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

Formulación	Para 1 mL de preparación
APS (Biorad)	100 mg
Agua desionizada y filtrada	1 mL

Elaboración:

1. Disolver y homogeneizar APS en agua desionizada filtrada.
2. Almacenar a -20°C.

4.7 Buffer de carga desnaturante. Solución utilizada para cargar muestra en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

Formulación	Para 9.5 mL de preparación
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 mL
Glicerol (Sigma)	2.5 mL
SDS 10 % (w/v)	2.0 mL
Azul de bromofenol 0.5 % (w/v)	0.2 mL
Agua desionizada y filtrada	3.55 mL

A 950 μ L de buffer de carga adicionar 50 μ L de β -mercaptoetanol (Sigma) antes de utilizar. Diluir la muestra al menos 1:2 con el buffer de carga.

Elaboración:

1. Disolver y homogeneizar 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, glicerol y agua desionizada filtrada.
2. Adicionar a la mezcla la solución de SDS 10 % (w/v), agitando suavemente.
3. Adicionar azul de bromofenol 0.5 % (w/v), realizar alícuotas y adicionar β -mercaptoetanol.
4. Almacenar a 4°C.

4.8 10x Buffer de corrida o tanque desnaturante, pH 8.3. Solución utilizada para conducir carga eléctrica a través de geles de poliacrilamida desnaturantes.

Formulación	Para 1 L de preparación
Tris base (Biorad)	30.3 g
Glicina (Biorad)	144.0 g
SDS (Biorad)	10.0 g
Agua desionizada filtrada	1 L

Elaboración:

1. Adicionar poco a poco la glicina en aproximadamente 800 mL de agua desionizada filtrada hasta disolver por completo.
2. Adicionar tris base hasta disolverlo y llevar el volumen a 1 L con agua desionizada y filtrada.
3. Una vez ajustado el volumen adicionar espátula a espátula SDS hasta disolverlo por completo.
4. Almacenar a 4°C. **Nota: No ajustar pH**

4.9 Gel separador 12 % (v/v) de solución de acrilamida. Solución para elaborar geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

Formulación	Para 10 mL de preparación
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5 mL
SDS al 10 % (w/v)	100 μ L
Agua desionizada y filtrada	3.35 mL
Solución de acrilamida al 30 % (w/v)	4 mL
APS al 10 % (w/v)	50 μ L
TEMED (Biorad)	5 μ L

Elaboración:

1. Adicionar y mezclar solución de 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, SDS al 10 % (w/v), agua desionizada y filtrada, solución de acrilamida al 30 % (w/v).
2. Posteriormente adicionar APS al 10 % (w/v) y TEMED.

4.10 Gel concentrador 4 % (v/v) de solución de acrilamida. Solución para elaborar geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

Formulación	Para 5 mL de preparación
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.25 mL
SDS al 10 % (w/v)	50 μ L
Agua desionizada y filtrada	3.05 mL
Solución de acrilamida al 30 % (w/v)	0.665 mL
APS al 10 % (w/v)	25 μ L
TEMED (Biorad)	5 μ L

Elaboración:

1. Adicionar y mezclar solución de 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, SDS al 10 % (w/v), agua desionizada filtrada, solución de acrilamida al 30 % (w/v).
2. Posteriormente adicionar APS al 10 % (w/v) y TEMED.

4.11 Estándares de bajo peso molecular: Solución utilizada como referencia de pesos (KDa) de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

Formulación	Para 60 μ L de preparación
SDS PAGE STD Low range (Biorad)	3 μ L
Buffer de carga desnaturalizante, completar hasta	60 μ L

Elaboración:

1. Adicionar y mezclar SDS PAGE Low range con buffer de carga desnaturalizante.
2. Calentar solución a 95°C, durante 5 min.
3. Almacenar a -20°C.

4.12 Solución teñidora de azul de Coomassie: Solución utilizada para formar complejo colorido y teñir proteínas “*in situ*” en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

Formulación	Para 100 mL de preparación
Azul de Coomassie G-250 (Biorad)	100.0 mg
Metanol (J.T. Baker)	25 mL
Ácido acético glacial (J.T. Baker)	5 mL
Agua desionizada y filtrada, completar hasta	100 mL

Elaboración:

1. Disolver y homogeneizar azul de Coomassie G-250 en metanol.
2. Adicionar ácido acético glacial y agua desionizada y filtrada.
3. Almacenar a temperatura ambiente.

Nota: Este reactivo no se podrá reutilizar más de 5 veces.

4.13 Solución desteñidora: Solución utilizada para solubilizar solución teñidora utilizada en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

Formulación	Para 100 mL de preparación
Metanol (J.T. Baker)	10 mL
Ácido acético glacial (J.T. Baker)	10 mL
Agua desionizada filtrada completar hasta	100 mL

Elaboración (continuación):

1. Adicionar y homogeneizar metanol, ácido acético glacial y agua desionizada.
2. Almacenar a temperatura ambiente.

4.14 Tritón X-100 al 5 % (v/v). Solución renaturalizante de proteínas para zimografía en la detección de actividad enzimática “*in situ*” de las clonas esterasa positivas.

Formulación	Para 100 mL de preparación
Tritón X-100 (Sigma)	5 mL
Buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5, completar hasta	100 mL

Elaboración:

1. Disolver y homogeneizar tritón X-100 en buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.5.
2. Almacenar a temperatura ambiente.

5. ANTIBIÓTICOS

5.1 Kanamicina [50 mg/mL]. Antibiótico utilizado para realizar medio selectivo.

Formulación	Para 10 mL de preparación
Sulfato de Kanamicina (Sigma)	500.0 mg
Agua grado biología molecular	10 mL

Elaboración:

1. Disolver kanamicina en agua grado biología molecular.
2. Homogeneizar y esterilizar por filtración mediante la implementación de Millex con tamaño de poro de 0.22 μm .
3. Realizar alícuotas y almacenar a 4°C, en condiciones de oscuridad.

5.2 Tetraciclina [5 mg/mL]. Antibiótico utilizado para realizar medio selectivo.

Formulación	Para 10 mL de preparación
Tetraciclina (Sigma)	50.0 mg
Étanol absoluto al 95 % (v/v), en agua grado biología molecular	10 mL

Elaboración:

1. Disolver tetraciclina en etanol absoluto al 95 % (v/v).
2. Homogeneizar y esterilizar por filtración mediante la implementación de Millex con tamaño de poro de 0.22 μm .
3. Realizar alícuotas y almacenar a 4°C, en condiciones de obscuridad.

ANEXO II

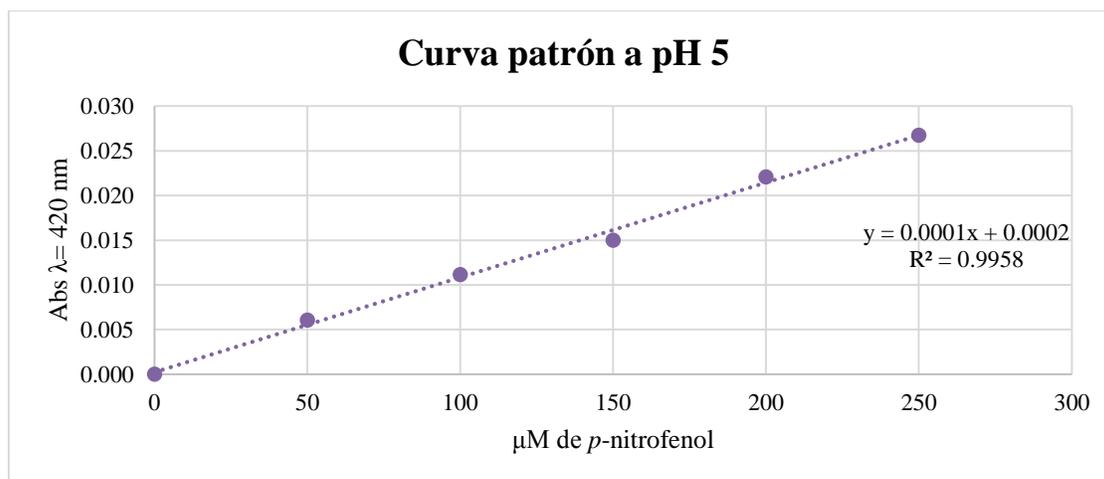
1. CURVAS PATRON DE *p*-NITROFENOL A DISTINTOS VALORES DE pH UTILIZADOS EN LA CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA

Figura 25. Curva patrón de *p*-nitrofenol a pH 5 (buffer de acetatos 0.5 M). Presentación del valor promedio de las mediciones (triplicado) así como su desviación estándar.

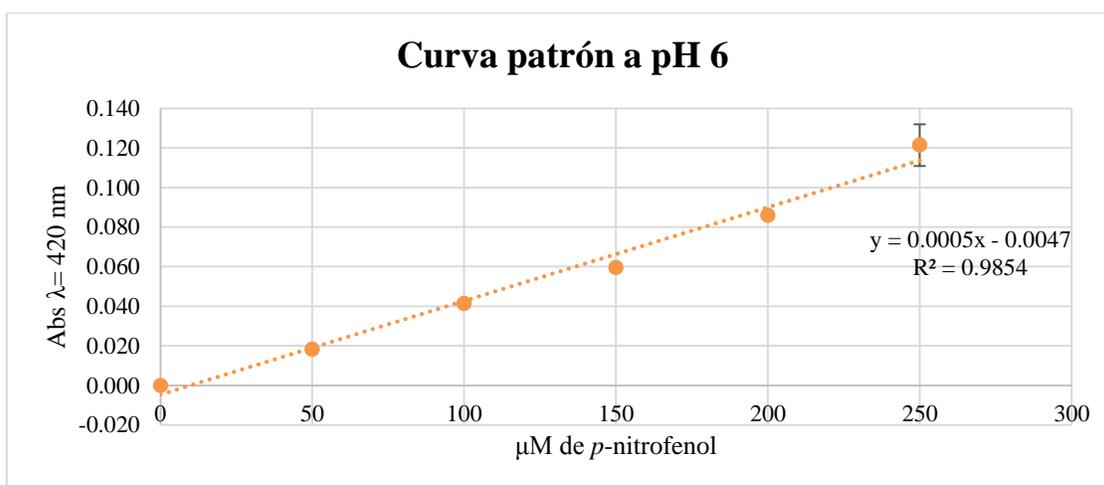


Figura 26. Curva patrón de *p*-nitrofenol a pH 6 (buffer de fosfato de potasio 0.5 M). Presentación del valor promedio de las mediciones (triplicado) así como su desviación estándar.

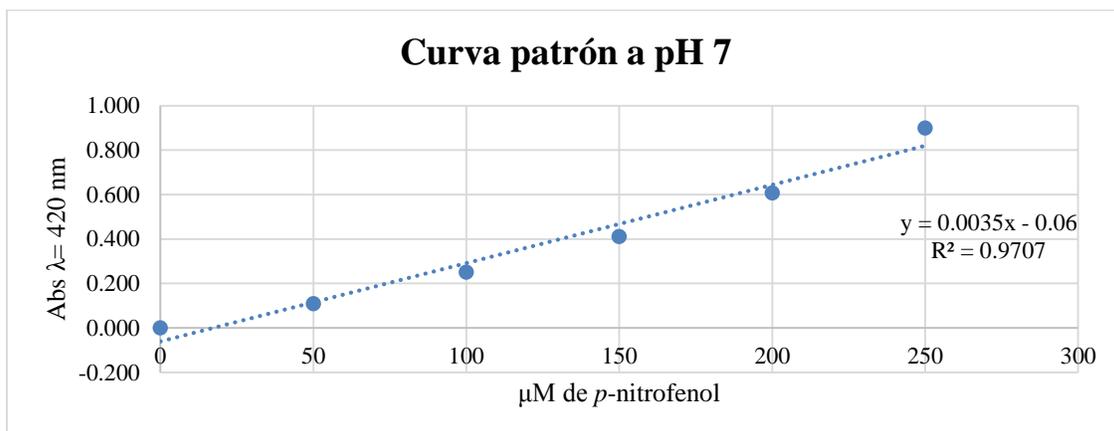


Figura 27. Curva patrón de *p*-nitrofenol a pH 7 (buffer de fosfato de potasio 0.5 M). Presentación del valor promedio de las mediciones (triplicado) así como su desviación estándar.

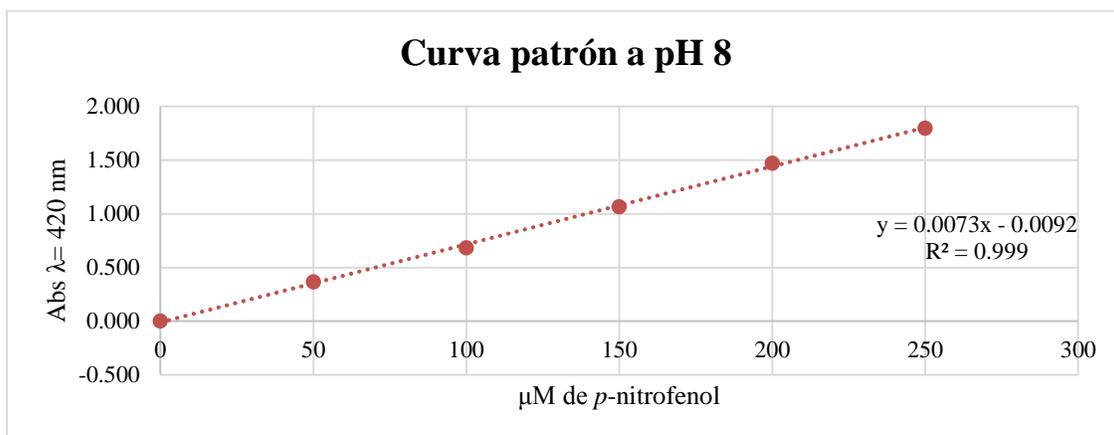


Figura 28. Curva patrón de *p*-nitrofenol a pH 8 (buffer tris base 0.5 M). Presentación del valor promedio de las mediciones (triplicado) así como su desviación estándar.

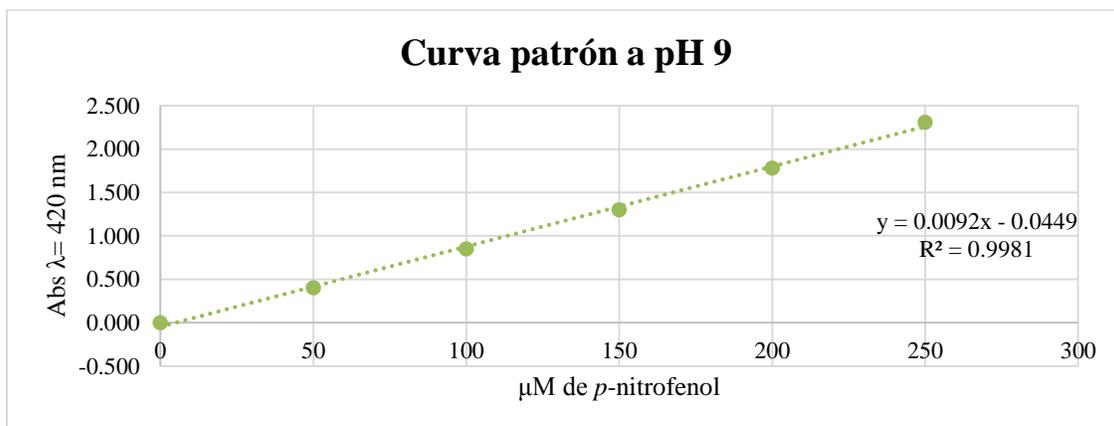


Figura 29. Curva patrón de *p*-nitrofenol a pH 9 (buffer tris base 0.5 M). Presentación del valor promedio de las mediciones (triplicado) así como su desviación estándar.

ANEXO III

1. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA PREPARACIÓN ENZIMÁTICA CRUDA DE LA CLONA Est-A

1.1 ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DEL ENSAYO

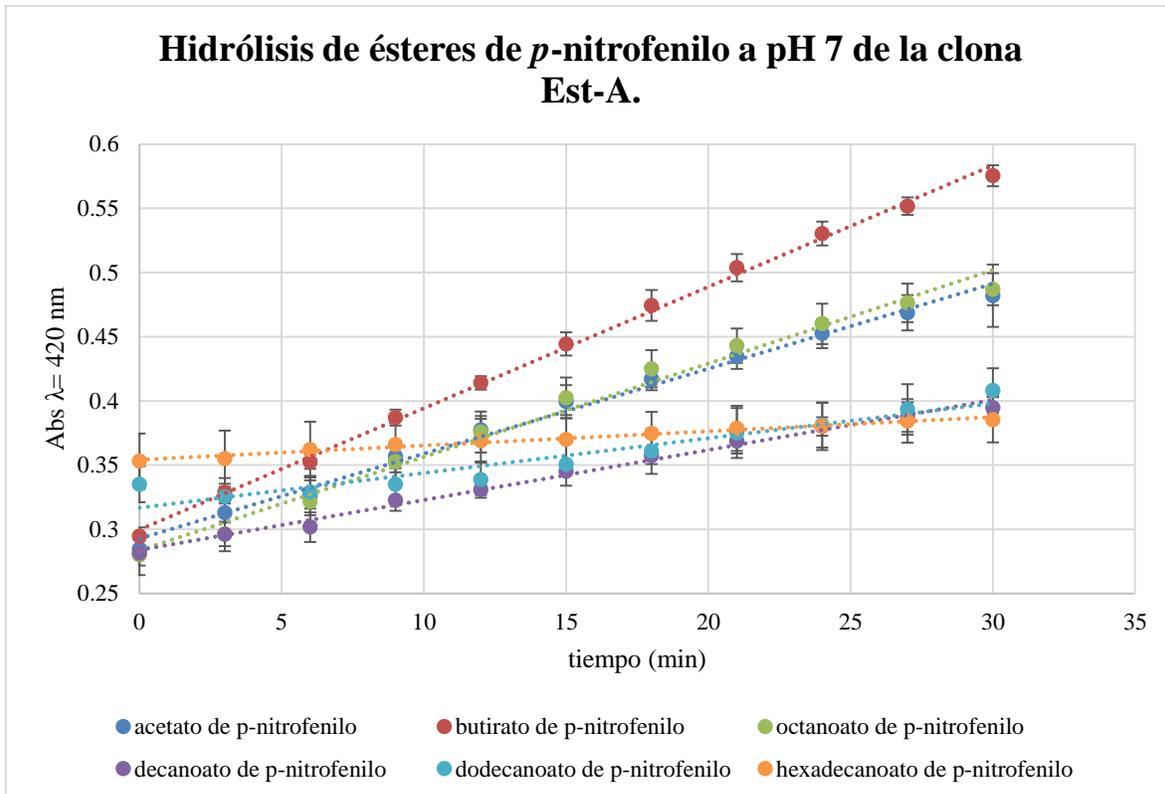
1.1.1 Actividad enzimática frente a ésteres de *p*-nitrofenilo de la fracción intracelular.

Figura 30. Valores de absorbancia a $\lambda=420\text{nm}$ de *p*-nitrofenol liberado de la hidrólisis de cada sustrato evaluado, a temperatura ambiente y pH 7. Presentación del valor promedio de tres mediciones y desviación estándar para cada punto.

Tabla 9. Resultados de regresiones lineales para cada uno de los sustratos evaluados.

Sustrato	Ecuación de la recta	R ²
Acetato de <i>p</i> -nitrofenilo	$y = 0.0066x + 0.2926$	R ² = 0.9922
Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	$y = 0.0095x + 0.2996$	R ² = 0.9978
Octanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	$y = 0.0073x + 0.2836$	R ² = 0.9878
Decanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	$y = 0.0039x + 0.2839$	R ² = 0.9917
Dodecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	$y = 0.0027x + 0.3167$	R ² = 0.9144
Hexadecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	$y = 0.0011x + 0.3542$	R ² = 0.9823

1.1.2 Análisis estadístico de la actividad enzimática observada para la determinación de sustrato óptimo del ensayo.

Tabla 10. Mediciones independientes de la actividad específica.

Sustrato	Actividad Específica (U ($\mu\text{mol } p\text{-nitrofenol/min}$) / mg de proteína)
Acetato de <i>p</i> -nitrofenilo	3.42×10^{-4}
Acetato de <i>p</i> -nitrofenilo	3.17×10^{-4}
Acetato de <i>p</i> -nitrofenilo	3.12×10^{-4}
Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	4.59×10^{-4}
Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	4.69×10^{-4}
Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	4.59×10^{-4}
Octanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	3.61×10^{-4}
Octanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	3.42×10^{-4}
Octanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	3.61×10^{-4}
Decanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	2.10×10^{-4}
Decanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	1.46×10^{-4}
Decanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	2.15×10^{-4}
Dodecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	1.27×10^{-4}
Dodecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	1.42×10^{-4}
Dodecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	1.27×10^{-4}
Hexadecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	3.42×10^{-5}
Hexadecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	5.86×10^{-5}
Hexadecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	6.83×10^{-5}

Tabla 11. Análisis de Varianza para determinación del sustrato óptimo del ensayo.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F_{exp}	Valor F_{tabla}
Sustrato	5	3.52×10^{-7}	7.04×10^{-8}	188.72	3.106
Error	12	4.48×10^{-9}	3.73×10^{-10}		
Total	17	3.57×10^{-7}			
Valor $F_{\text{exp}} >$ Valor $F_{\text{tabla } \alpha 0.05} =$ Si hay diferencia significativa.					

Tabla 12. Método LSD de Fisher con confianza de 95 %.

Sustrato	N	Media	Agrupación
Butirato de <i>p</i>-nitrofenilo	3	4.621×10^{-4}	A
Octanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	3	3.547×10^{-4}	B
Acetato de <i>p</i> -nitrofenilo	3	3.238×10^{-4}	B
Decanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	3	1.904×10^{-4}	C
Dodecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	3	1.318×10^{-4}	D
Hexadecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	3	5.37×10^{-5}	E

1.2 pH ÓPTIMO DEL ENSAYO

1.2.1 Actividad enzimática frente a butirato de *p*-nitrofenilo de la fracción intracelular a distintos valores de pH.

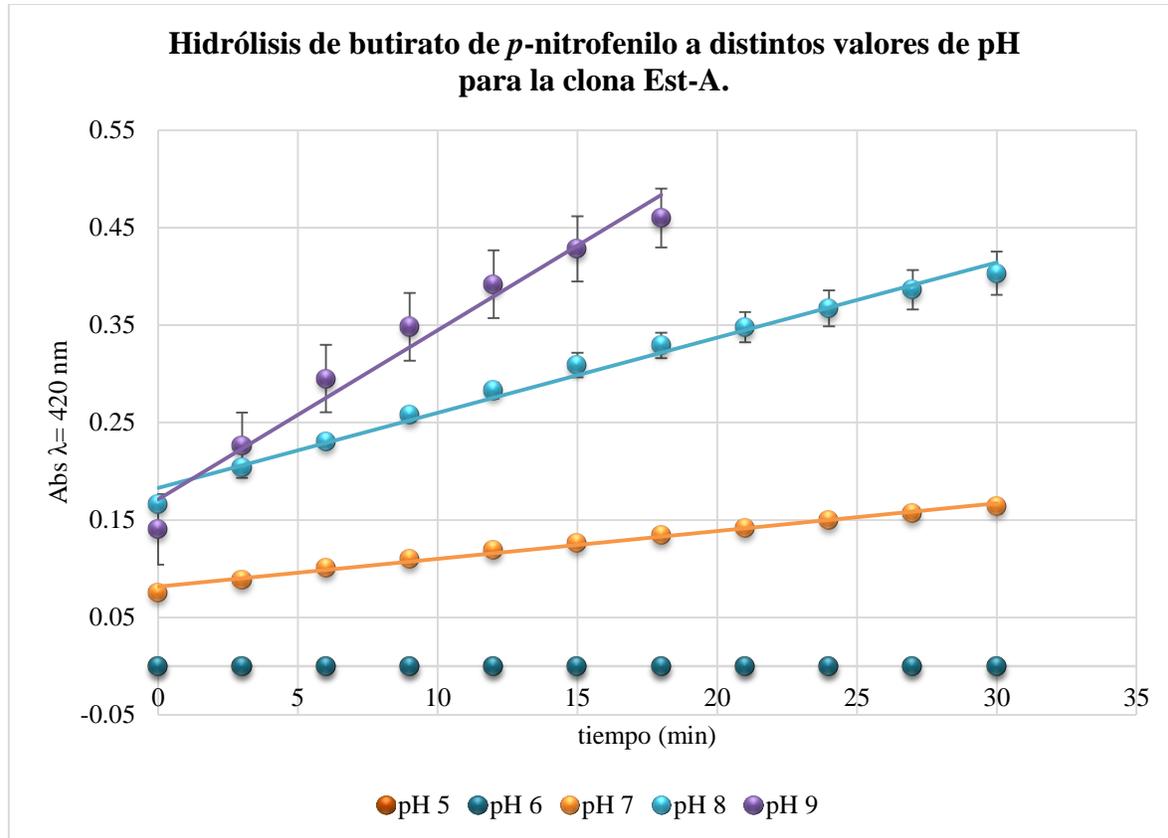


Figura 31. Valores de absorbancia a $\lambda=420\text{nm}$ de *p*-nitrofenol liberado de la hidrólisis de butirato de *p*-nitrofenilo evaluado a temperatura ambiente, a distintos valores de pH. Presentación del valor promedio de tres mediciones y desviación estándar para cada punto.

Tabla 13. Resultados de regresiones lineales para cada uno de los pHs evaluados.

pH	Ecuación de la recta	R ²
pH 5 (Buffer de acetatos)	--	--
pH 6 (Buffer de fosfato de potasio)	--	--
pH 7 (Buffer de fosfato de potasio)	$y = 0.0028x + 0.0818$	$R^2 = 0.9897$
pH 8 (Buffer Tris base)	$y = 0.0077x + 0.1828$	$R^2 = 0.9886$
pH 9 (Buffer Tris base)	$y = 0.0174x + 0.171$	$R^2 = 0.9678$

1.2.2 Análisis estadístico de la actividad enzimática observada para la determinación de pH óptimo del ensayo.

Tabla 14. Mediciones independientes de la actividad específica.

pH /butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	Actividad Específica (U (μmol <i>p</i> -nitrofenol/min) / mg de proteína)
pH 5	0.0
pH 5	0.0
pH 5	0.0
pH 6	0.0
pH 6	0.0
pH 6	0.0
pH 7	1.46x10 ⁻⁴
pH 7	1.27x10 ⁻⁴
pH 7	1.42x10 ⁻⁴
pH 8	1.85x10 ⁻⁴
pH 8	1.94x10 ⁻⁴
pH 8	1.64x10 ⁻⁴
pH 9	3.29x10 ⁻⁴
pH 9	3.21x10 ⁻⁴
pH 9	3.18x10 ⁻⁴

Tabla 15. Análisis de Varianza para pH óptimo del ensayo.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F _{exp}	Valor F _{tabla}
pH / butirato de <i>p</i> -NF	4	2.21x10 ⁻⁷	5.51x10 ⁻⁸	728.78	3.478
Error	10	7.57x10 ⁻¹⁰	7.57x10 ⁻¹¹		
Total	14	2.21x10 ⁻⁷			
Valor F_{exp} > Valor F_{tabla} α0.05 = Si hay diferencia significativa.					

Tabla 16. Método LSD de Fisher con confianza de 95 %.

pH / butirato de <i>p</i> -NF	N	Media	Agrupación
pH 9	3	3.225x10⁻⁴	A
pH 8	3	1.810x10 ⁻⁴	B
pH 7	3	1.383x10 ⁻⁴	C
pH 6	3	0.0	D
pH 5	3	0.0	D

1.3 TEMPERATURA ÓPTIMA DEL ENSAYO

1.3.1 Actividad enzimática frente a butirato de *p*-nitrofenilo de la fracción intracelular a pH 9 y diferentes valores de temperatura.

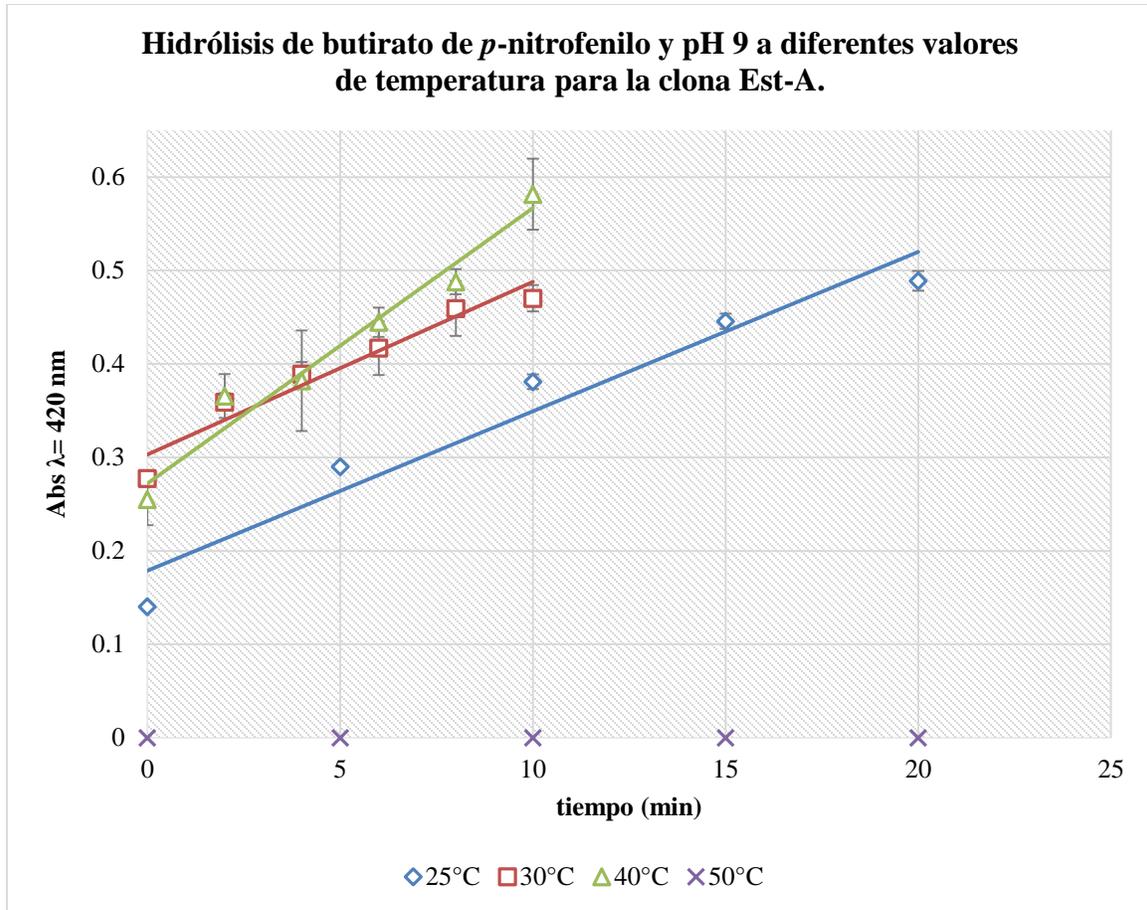


Figura 32. Valores de absorbancia a $\lambda=420\text{nm}$ de *p*-nitrofenol liberado de la hidrólisis de butirato de *p*-nitrofenilo evaluado a pH 9, a distintos valores de temperatura. Presentación del valor promedio de tres mediciones y desviación estándar para cada punto.

Tabla 17. Resultados de regresiones lineales para cada valor de temperatura evaluada.

Temperatura	Ecuación de la recta	R ²
25°C	$y = 0.0171x + 0.1786$	R ² = 0.9451
30°C	$y = 0.0185x + 0.303$	R ² = 0.9384
40°C	$y = 0.0295x + 0.2721$	R ² = 0.9653
50°C	--	--

1.3.2 Análisis estadístico de la actividad enzimática observada para la determinación de temperatura óptima del ensayo.

Tabla 18. Mediciones independientes de la actividad específica.

Temperatura / butirato de <i>p</i> -nitrofenilo / pH 9	Actividad Específica (U (μmol <i>p</i> -nitrofenol/min) / mg de proteína)
25°C	1.83x10 ⁻³
25°C	1.87x10 ⁻³
25°C	1.96x10 ⁻³
30°C	2.13x10 ⁻³
30°C	2.00x10 ⁻³
30°C	1.99x10 ⁻³
40°C	3.40x10 ⁻³
40°C	3.27x10 ⁻³
40°C	3.09x10 ⁻³
50°C	0.0
50°C	0.0
50°C	0.0

Tabla 19. Análisis de Varianza para temperatura óptima del ensayo.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F _{exp}	Valor F _{tabla}
Temperatura	3	1.63x10 ⁻⁵	5.43x10 ⁻⁶	630.25	4.066
Error	8	6.89x10 ⁻⁸	8.61x10 ⁻⁹		
Total	11	1.64x10 ⁻⁵			
Valor F_{exp} > Valor F_{tabla} α0.05 = Si hay diferencia significativa.					

Tabla 20. Método LSD de Fisher con confianza de 95 %.

Temperatura / butirato de <i>p</i> -NF / pH 9	N	Media	Agrupación
40°C	3	3.2566x10⁻³	A
30°C	3	2.0409x10 ⁻³	B
25°C	3	1.8862x10 ⁻³	B
50°C	3	0.0	C

ANEXO IV

1. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA PREPARACIÓN ENZIMÁTICA CRUDA DE LA CLONA Est-C

1.1 ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DEL ENSAYO

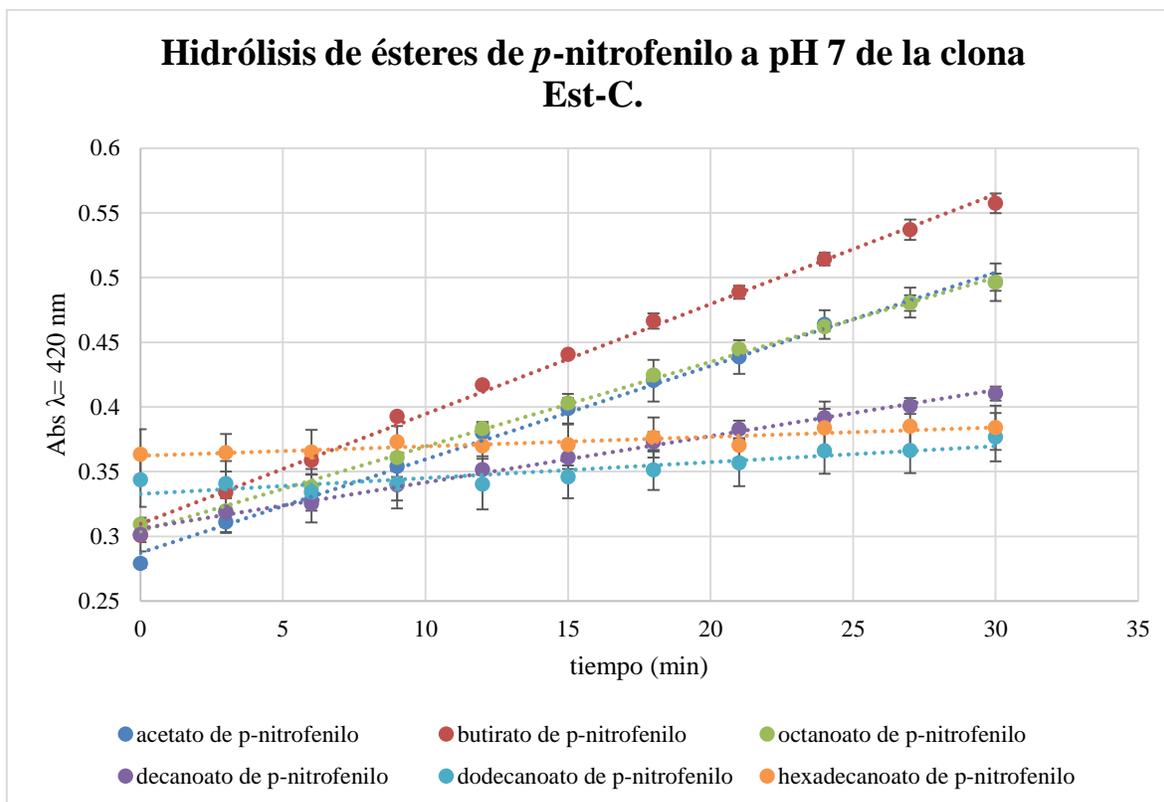
1.1.1 Actividad enzimática frente a ésteres de *p*-nitrofenilo de la fracción intracelular.

Figura 33. Valores de absorbancia a $\lambda=420\text{nm}$ de *p*-nitrofenol liberado de la hidrólisis de cada sustrato evaluado, a temperatura ambiente y pH 7. Presentación del valor promedio de tres mediciones y desviación estándar para cada punto.

Tabla 21. Resultados de regresiones lineales para cada uno de los sustratos evaluados.

Sustrato	Ecuación de la recta	R ²
Acetato de <i>p</i> -nitrofenilo	$y = 0.0072x + 0.2871$	R ² = 0.996
Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	$y = 0.0085x + 0.3096$	R ² = 0.9966
Octanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	$y = 0.0065x + 0.3039$	R ² = 0.9974
Decanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	$y = 0.0036x + 0.306$	R ² = 0.995
Dodecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	$y = 0.0012x + 0.3326$	R ² = 0.8144
Hexadecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	$y = 0.0007x + 0.3622$	R ² = 0.8321

1.1.2 Análisis estadístico de la actividad enzimática observada para la determinación de sustrato óptimo del ensayo.

Tabla 22. Mediciones independientes de la actividad específica.

Sustrato	Actividad Específica (U ($\mu\text{mol } p\text{-nitrofenol/min}$) / mg de proteína)
Acetato de <i>p</i> -nitrofenilo	4.47×10^{-4}
Acetato de <i>p</i> -nitrofenilo	4.29×10^{-4}
Acetato de <i>p</i> -nitrofenilo	4.72×10^{-4}
Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	5.40×10^{-4}
Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	5.15×10^{-4}
Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	5.28×10^{-4}
Octanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	3.91×10^{-4}
Octanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	4.22×10^{-4}
Octanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	4.04×10^{-4}
Decanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	1.86×10^{-4}
Decanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	2.30×10^{-4}
Decanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	2.48×10^{-4}
Dodecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	1.12×10^{-4}
Dodecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	5.59×10^{-5}
Dodecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	6.21×10^{-5}
Hexadecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	6.21×10^{-6}
Hexadecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	2.48×10^{-5}
Hexadecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	4.97×10^{-5}

Tabla 23. Análisis de Varianza para determinación del sustrato óptimo del ensayo.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F_{exp}	Valor F_{tabla}
Sustrato	5	6.44×10^{-7}	1.29×10^{-7}	233.83	3.106
Error	12	6.61×10^{-9}	5.51×10^{-10}		
Total	17	6.50×10^{-7}			
Valor $F_{\text{exp}} > \text{Valor } F_{\text{tabla } \alpha 0.05} = \text{Si hay diferencia significativa.}$					

Tabla 24. Método LSD de Fisher con confianza de 95 %.

Sustrato	N	Media	Agrupación
Butirato de <i>p</i>-nitrofenilo	3	5.279×10^{-4}	A
Acetato de <i>p</i> -nitrofenilo	3	4.492×10^{-4}	B
Octanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	3	4.057×10^{-4}	C
Decanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	3	2.215×10^{-4}	D
Dodecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	3	7.66×10^{-5}	E
Hexadecanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	3	2.69×10^{-5}	F

1.2 pH ÓPTIMO DEL ENSAYO

1.2.1 Actividad enzimática frente a butirato de *p*-nitrofenilo de la fracción intracelular a distintos valores de pH.

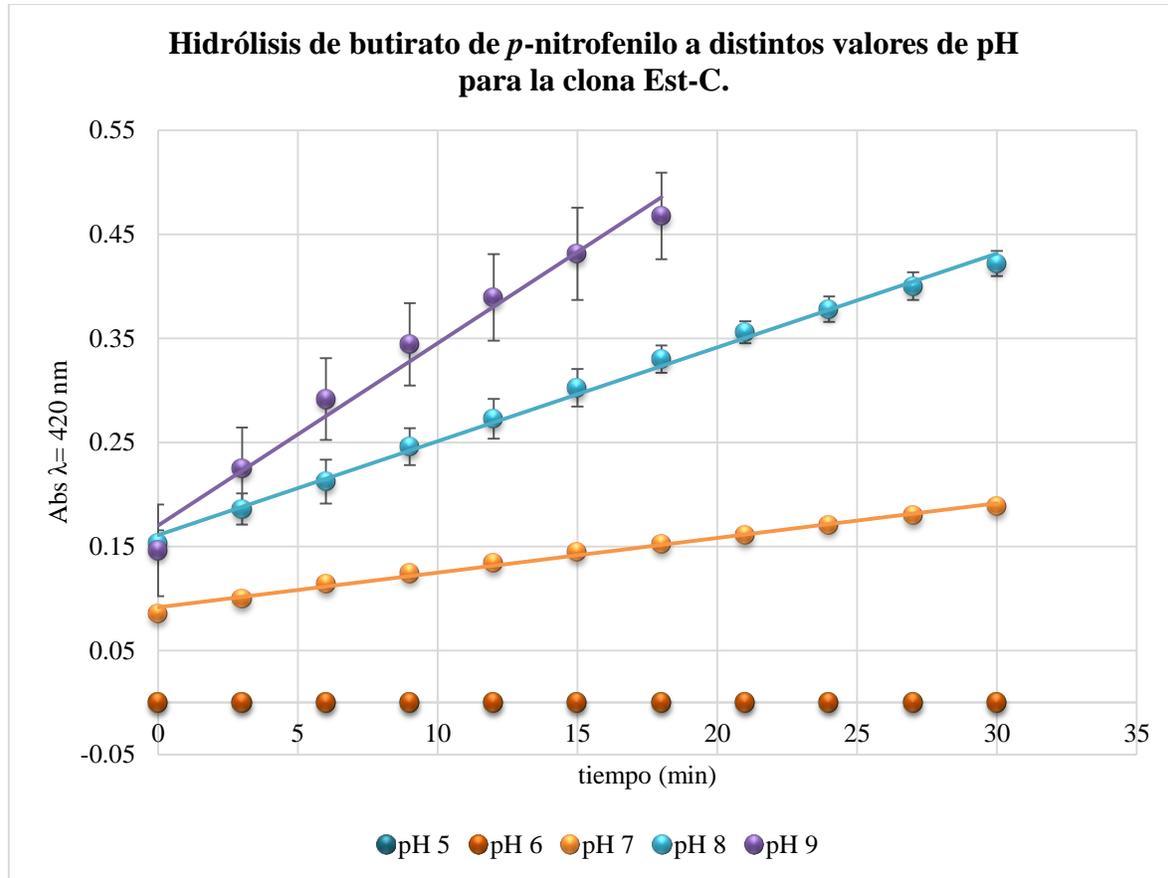


Figura 34. Valores de absorbancia a $\lambda=420\text{nm}$ de *p*-nitrofenol liberado de la hidrólisis de butirato de *p*-nitrofenilo evaluado a temperatura ambiente, a distintos valores de pH. Presentación del valor promedio de tres mediciones y desviación estándar para cada punto.

Tabla 25. Resultados de regresiones lineales para cada uno de los pHs evaluados.

pH	Ecuación de la recta	R ²
pH 5 (Buffer de acetatos)	--	--
pH 6 (Buffer de fosfato de potasio)	--	--
pH 7 (Buffer de fosfato de potasio)	$y = 0.0033x + 0.0914$	$R^2 = 0.9924$
pH 8 (Buffer Tris base)	$y = 0.0090x + 0.161$	$R^2 = 0.9959$
pH 9 (Buffer Tris base)	$y = 0.0175x + 0.1701$	$R^2 = 0.9808$

1.2.2 Análisis estadístico de la actividad enzimática observada para la determinación de pH óptimo.

Tabla 26. Mediciones independientes de la actividad específica.

pH / butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	Actividad Específica (U (μmol <i>p</i> -nitrofenol/min) / mg de proteína)
pH 5	0.0
pH 5	0.0
pH 5	0.0
pH 6	0.0
pH 6	0.0
pH 6	0.0
pH 7	2.05x10 ⁻⁴
pH 7	2.05x10 ⁻⁴
pH 7	2.11x10 ⁻⁴
pH 8	2.59x10 ⁻⁴
pH 8	2.71x10 ⁻⁴
pH 8	2.74x10 ⁻⁴
pH 9	4.16x10 ⁻⁴
pH 9	4.16x10 ⁻⁴
pH 9	4.13x10 ⁻⁴

Tabla 27. Análisis de Varianza para pH óptimo del ensayo.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F _{exp}	Valor F _{tabla}
pH / butirato de <i>p</i> -NF	4	3.85x10 ⁻⁷	9.64x10 ⁻⁸	6275.83	3.478
Error	10	1.54x10 ⁻¹⁰	1.54x10 ⁻¹¹		
Total	14	3.86x10 ⁻⁷			
Valor F_{exp} > Valor F_{tabla} α0.05 = Si hay diferencia significativa.					

Tabla 28. Método LSD de Fisher con confianza de 95 %.

pH / butirato de <i>p</i> -NF	N	Media	Agrupación
pH 9	3	4.150x10⁻⁴	A
pH 8	3	2.680x10 ⁻⁴	B
pH 7	3	2.070x10 ⁻⁴	C
pH 6	3	0.0	D
pH 5	3	-0.0	D

1.3 TEMPERATURA ÓPTIMA DEL ENSAYO

1.3.1 Actividad enzimática frente a butirato de *p*-nitrofenilo de la fracción intracelular a pH 9 y diferentes valores de temperatura.

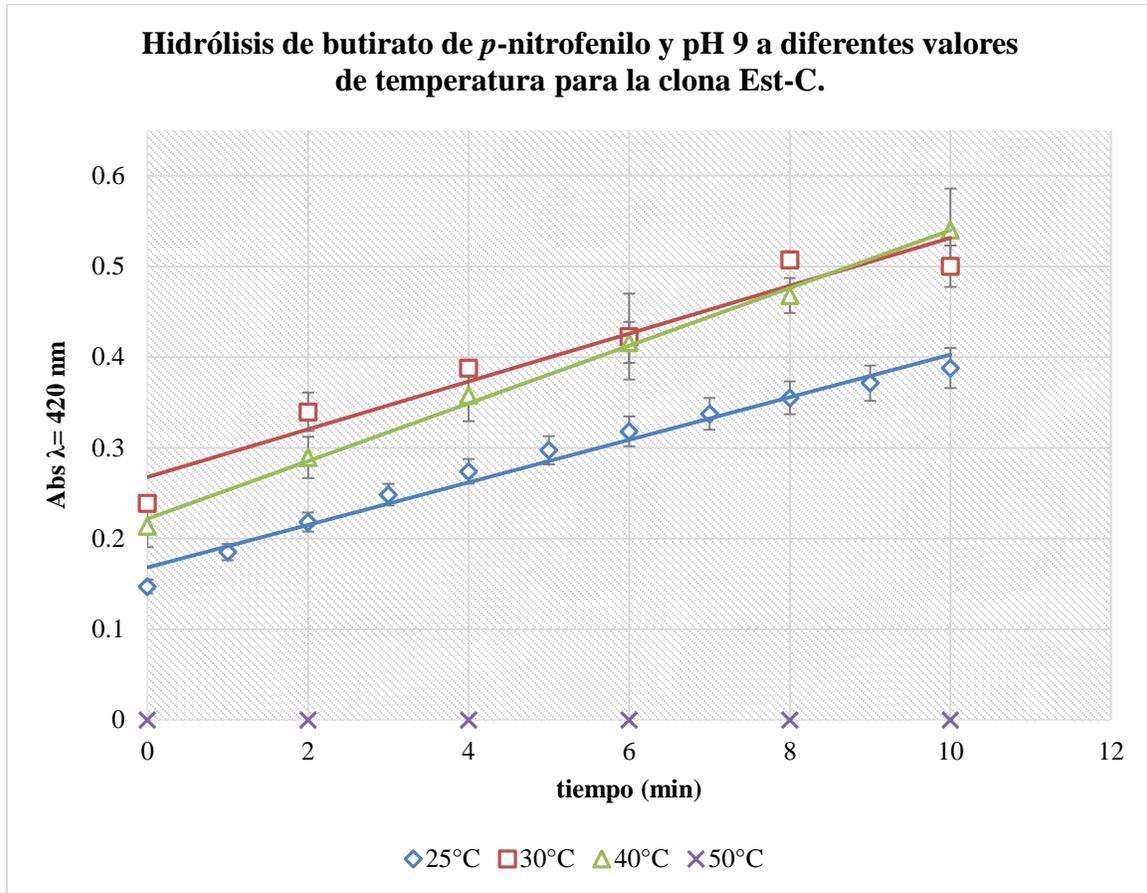


Figura 35. Valores de absorbancia a $\lambda=420\text{nm}$ de *p*-nitrofenol liberado de la hidrólisis de butirato de *p*-nitrofenilo evaluado a pH 9, a distintos valores de temperatura. Presentación del valor promedio de tres mediciones y desviación estándar para cada punto.

Tabla 29. Resultados de regresiones lineales para cada valor de temperatura evaluada.

Temperatura	Ecuación de la recta	R^2
25°C	$y = 0.0235x + 0.168$	$R^2 = 0.9795$
30°C	$y = 0.0264x + 0.2676$	$R^2 = 0.9378$
40°C	$y = 0.0318x + 0.2218$	$R^2 = 0.9967$
50°C	--	--

1.3.2 Análisis estadístico de la actividad enzimática observada para la determinación de temperatura óptima del ensayo.

Tabla 30. Mediciones independientes de la actividad específica.

Temperatura / butirato de <i>p</i> -nitrofenilo / pH 9	Actividad Específica (U (μmol <i>p</i> -nitrofenol/min) / mg de proteína)
25°C	2.00x10 ⁻³
25°C	1.88x10 ⁻³
25°C	1.78x10 ⁻³
30°C	2.29x10 ⁻³
30°C	2.11x10 ⁻³
30°C	1.96x10 ⁻³
40°C	2.53x10 ⁻³
40°C	2.70x10 ⁻³
40°C	2.44x10 ⁻³
50°C	0.0
50°C	0.0
50°C	0.0

Tabla 31. Análisis de Varianza para temperatura óptima del ensayo.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F _{exp}	Valor F _{tabla}
Temperatura	3	1.15x10 ⁻⁵	3.82x10 ⁻⁶	263.41	4.066
Error	8	1.16x10 ⁻⁷	1.45x10 ⁻⁸		
Total	11	1.16x10 ⁻⁵			
Valor F_{exp} > Valor F_{tabla} α0.05 = Si hay diferencia significativa.					

Tabla 32. Método LSD de Fisher con confianza de 95 %.

Temperatura / butirato de <i>p</i> -NF / pH 9	N	Media	Agrupación
40°C	3	2.5578x10⁻³	A
30°C	3	2.1208x10 ⁻³	B
25°C	3	1.8875x10 ⁻³	C
50°C	3	0.0	D