

## CARACTERIZACIÓN DE LA ESTERASA EstCP3 OBTENIDA DE UNA LIBRERÍA METAGENÓMICA DE ATOLE AGRIO.

Carlina Peña-García<sup>1</sup>, Humberto García-Arellano<sup>2</sup>, Juan Carlos Sigala-Alanís<sup>3</sup>, Carmen Wachter-Rodarte<sup>4</sup>, Judith Espinosa-Moreno<sup>5</sup>, Teresita Sainz-Espuñes<sup>6</sup> y Dolores Reyes-Duarte<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, UAM-Cuajimalpa; <sup>2</sup> Depto. de Ciencias Ambientales, UAM-Lerma; <sup>3</sup>Depto. de Procesos y Tecnología, UAM-Cuajimalpa; <sup>4</sup>Depto. de Alimentos y Biotecnología, Fac. de Química, UNAM; <sup>5</sup>División Académica de Ciencias Agropecuarias, UJAT; <sup>6</sup>Depto. de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco. Correo electrónico: carlinapena@yahoo.it

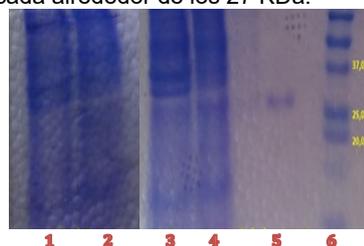
*Palabras clave: esterasa, librería metagenómica, atole agrio.*

**Introducción.** El atole agrio es una bebida fermentada que se prepara a partir de maíz de dobla o maíz maduro (en donde el maíz es doblado en la misma planta) el cual es cosechado después de 85 a 100 días de sembrarse, desgranado y molido con agua para formar una masa la cual se fermenta durante 12 horas. Posteriormente se tamiza en una tela de tejido fino y se gelatiniza hasta lograr una consistencia de atole (1). En el estudio microbiológico realizado por Valderrama (2), utilizando técnicas tradicionales de cultivo, se demostró que este alimento presenta una compleja microbiota incluyendo: bacterias lácticas amilolíticas, bacterias lácticas no amilolíticas, mesófilos aerobios, coliformes, hongos y levaduras, llegando el pH de la fermentación final a valores de 4.0. En vista de la gran riqueza microbiológica que constituye el atole agrio, el objetivo de la presente investigación fue realizar una librería metagenómica de los organismos fermentadores (cultivables y no) y realizar la búsqueda funcional de esterases para su posterior caracterización.

**Metodología.** El atole agrio fue elaborado respetando la forma tradicional de elaboración según la zona de Mascuspana, Tabasco. Posteriormente se obtuvo el metagenoma de la fermentación sólida utilizando un protocolo manual de extracción de DNA (3), y se usó para hacer una librería metagenómica en fagémidos del Sistema Zap Express Vector (Agilent Technologies), la cual se individualizó en cajas de 384 pocillos. El escrutinio se llevó a cabo en cajas Petri de 12X12 cm evaluando los 384 fagémidos de cada caja simultáneamente en medio LB y kanamicina e incubados a 37° C overnight. El sustrato utilizado fue acetato de naftilo y el indicador fue Fast Blue RR (4). Los fagémidos que presentaron un precipitado marrón se consideraron positivos y se secuenció su inserto. Los clones con actividad esterasa seleccionados se purificaron y caracterizaron (preferencia por sustrato, temperatura y pH óptimos, presencia de iones y solventes orgánicos, actividad frente a detergentes, entre otros).

**Resultados.** Se obtuvo una librería metagenómica de 50 mil clones de los cuales se individualizaron 4,608 fagémidos. Se obtuvieron 3 clones positivos y se seleccionó uno con actividad esterasa confirmada, el cual se nombró EstCP3. El inserto total tuvo una longitud de 5,126 pb proveniente de la enterobacteria *Klebsiella* sp., según los resultados arrojados por el Blastx. Diseñando los primers necesarios, se flanqueó la secuencia de la esterasa y se secuenció, dando como resultado una enzima de 223 aminoácidos con un peso molecular teórico de 26.54 KDa. Esta esterasa se subclonó como proteína de fusión con

colas de histidina en el vector pET28b(+) y se purificó mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel. En la figura 1 se aprecia una banda única correspondiente a EstCP3 purificada alrededor de los 27 KDa.



**Figura 1.** Electroforesis desnaturalizante al 15%. Carriles 1 y 2: fracción proteica total de *E. Coli* BL21; 3 y 4: fracción proteica total de *E. Coli* BL21 + vector; 5: EstCP3 purificada y 6: marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standard, BioRad).

La EstCP3 tiene preferencia por ácidos grasos de cadena corta (C4). La temperatura óptima es de 37° C y muestra actividad entre un amplio perfil de pH entre 6.0 y 9.0. Se evaluó su actividad relativa en presencia de iones, manteniendo el 100% con Ba<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, pero ante Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> Ca<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup>, su actividad decrece hasta a un 20%. Frente a EtOH, MeOH, acetona y DMF, su actividad disminuye un 50%; en presencia de 5% DMSO, mantiene el 100% de su actividad.

**Conclusiones.** Los alimentos fermentados constituyen un universo interesante para la búsqueda de metabolitos y enzimas con potencial biotecnológico. La estrategia de metagenómica funcional permite explorar metagenomas de microorganismos provenientes de distintos ambientes con base en su actividad enzimática y no solo con base en sus secuencias. Esto permite encontrar y asegurarse de que existe una actividad presente y no solo teórica. El estudio filogenético de la EstCP3 está en proceso y brindará información sobre otras características de las enzimas con las que está relacionada.

### Bibliografía.

- Centurión D *et al.* (2016). Alimentos tradicionales que se generan en la cocina rural tabasqueña durante el desarrollo de la mazorca de maíz. En: *El maíz nativo en México, una aproximación crítica de los estudios rurales*. López I. *et al.* (eds) UAM. México. pp 137-171.
- Valderrama A. (2012). Diversidad de bacterias lácticas del atole agrio de Villahermosa Tabasco. México: UNAM.
- Kate W. (2001). *Curr Prot in Mol Biol*. 2001:2-4.
- Reyes-Duarte, D. *et al.* (2012). En *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 861, Part 2, 101-113. Ed. G. Sandoval. Humana Press, Springer. New York.

