



## ELABORACIÓN DE UN BANCO METAGENOMICO DEL QUESO COTIJA E IDENTIFICACIÓN DE ESTERASAS.

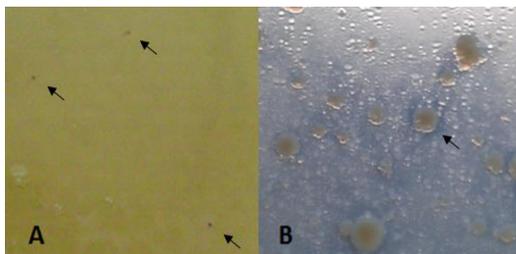
Ingrid Torres-Rodríguez<sup>1</sup>, Carlos M. Díaz-Vega<sup>1</sup>, Rafael E. Hernández-Pérez<sup>1</sup>, Carolina Peña<sup>1</sup>, Dolores Reyes-Duarte<sup>2</sup> y Maricarmen Quirasco<sup>1</sup>. 1. Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. Química, Depto. Alimentos y Biotecnología, Cd. Universitaria, 04510, D.F. México. [quirabma@unam.mx](mailto:quirabma@unam.mx), Tel. (55)5622-5305. 2. Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Depto. Procesos y Tecnología, México, D.F. 05300.

*Palabras clave: Biblioteca metagenómica, queso madurado, lipasas.*

**Introducción.** El queso Cotija es un producto lácteo tradicional mexicano con alto contenido graso (min. 24% base húmeda). Estudios anteriores han permitido aislar e identificar varios microorganismos lipolíticos (1, 2). Sin embargo, no se ha explorado en su totalidad la capacidad lipolítica de las bacterias del queso Cotija, incluyendo a las que no se han podido cultivar. El objetivo de este trabajo fue elaborar una biblioteca metagenómica del queso Cotija y hacer un escrutinio para buscar hidrolasas de ésteres carboxílicos.

**Metodología.** La biblioteca se construyó utilizando ADN metagenómico del queso Cotija, digerido con la enzima *Bam* HI para generar fragmentos de 5-7 kbp que fueron clonados en el vector ZAP Express y empaquetados en el bacteriófago  $\lambda$ . El análisis funcional de esterases se realizó sobre las unidades formadoras de placa (UFP) por hidrólisis de  $\alpha$ -naftil acetato/Fast Blue RR, inducidas con IPTG (3). Los insertos de las clonas positivas se escindieron para formar el vector pBK-CMV recombinante e introducirlo en la cepa *Escherichia coli*-XL0LR para su expresión por inducción con IPTG. Se confirmó la actividad esterasa de las clonas aisladas en placas de agar LB + tributirina (1%). El tamaño de los insertos fue confirmado por digestión enzimática y amplificado por PCR con cebadores universales (T7/T3). Los amplicones fueron secuenciados utilizando la metodología primer walking.

**Resultados.** La biblioteca metagenómica construida contiene 136,950 UFP, el tamaño de inserto promedio es de 5 Kpb, por lo que el tamaño de la biblioteca es aproximadamente de 0.685 Gpb. La biblioteca se amplificó a 22.65 Gpb. El análisis funcional de esterases permitió el aislamiento de 13 clonas de aproximadamente 77,000 analizadas. En la Figura 1 se muestra la capacidad de hidrólisis de  $\alpha$ -naftil acetato y de tributirina de algunas de las clonas.



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

**Tabla 1.** Tamaño de inserto en el vector pBK-CMV de las clonas esterasa positivas y relación diámetro halo/diámetro colonia, en agar LB + tributirina.

Clona	Tamaño de amplicón (Kpb)	$\theta$ Halo / $\theta$ Colonia (mm)
EstQC-A	5.1	1.5
EstQC-B	6.4	1.6
EstQC-C	7	1.3
<b>EstQC-D</b>	7	<b>2.1</b>
EstQC-E	5.3	1.5
<b>EstQC-F</b>	6.1	<b>2.3</b>
EstQC-G	5.2	1.6
EstQC-H	4.6	1.5
EstQC-I	4.5	1.8
EstQC-J	4.2	1.7
EstQC-K	4.8	1.5
EstQC-L	4.6	1.8
EstQC-M	5.1	1.4

Las 13 clonas aisladas presentan actividad esterasa extracelular en agar LB + tributirina (1%) (Tabla 1); así mismo, mostraron actividad intra y extracelular en un ensayo en líquido contra  $\alpha$ -naftil acetato. Las clonas D y F sobresalen por su actividad extracelular. Los insertos fueron secuenciados y se buscaron marcos de lectura abiertos para esterases bacterianas. Las secuencias codificantes fueron alineadas en la base de datos no redundante en el NCBI y bases de datos para esterases.

**Conclusiones.** La exploración de la capacidad lipolítica de la microbiota del queso Cotija a través de la elaboración de un banco metagenómico permitió la identificación de enzimas con un potencial de aplicación en alimentos.

**Agradecimiento.** PAPIIT IN218613, DGAPA-UNAM.

### Bibliografía.

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