



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN BIOCATALIZADOR CON ACTIVIDAD ESTERASA OBTENIDO DEL METAGENOMA DEL POZOL

Gloria Carlina Peña García y Dolores Reyes-Duarte. Departamento de Procesos y Tecnología, UAM-Cuajimalpa, Artificios 40, 6° Piso, Col. Hidalgo, Delegación Álvaro Obregón, C.P. 01120, México D.F., dreyes@correo.cua.uam.mx

Palabras clave: pozol, metagenómica, hidrolasas.

Introducción. El pozol es una bebida fermentada tradicional mexicana, que se consume en el sureste del país. Durante su elaboración es inoculado de manera natural y su fermentación es llevada a cabo por una gran cantidad de microorganismos incluidos bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Dado que los microorganismos son la mayor fuente de diversidad funcional, el pozol fermentado constituye una fuente potencial de enzimas. Actualmente, las industrias buscan nuevos biocatalizadores que puedan ayudar a realizar procesos limpios. Para alcanzar este objetivo, se han aplicado técnicas como la metagenómica, la cual se basa en la extracción del material genético (ADN) global de un conjunto de microorganismos presentes en una fuente natural y su clonación en genotecas de ADN recombinante para ser sometidas posteriormente a métodos de búsqueda de enzimas, tanto por secuencia como por actividad⁽¹⁾.

El objetivo del presente trabajo fue explorar el potencial funcional del metagenoma del pozol⁽²⁾ a través de la búsqueda y caracterización de biocatalizadores mediante el desarrollo de una genoteca metagenómica en bacteriófagos lambda.

Metodología. La genoteca se construyó utilizando un ADN metagenómico aislado de pozol enriquecido con camote proveniente de Tabasco. La fermentación de la masa de pozol se continuó en el laboratorio en condiciones estériles a 30°C durante 3 días más, obteniendo un pH final de 4.0. Se extrajo el ADN metagenómico utilizando un kit comercial de MOBIO al que se le adicionaron amilasas y glucosidasas. El ADN se fragmentó con la enzima Sau3A y los fragmentos entre 7 y 9 kpb se clonaron en el vector pBK-CMV y empaquetaron en el bacteriófago λ , obteniéndose la genoteca. Para el análisis funcional de la genoteca⁽³⁾, se procedió a infectar la cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue y sobre las placas de lisis se añadió el sustrato (acetato de α -naftilo [20 mg/mL] y Fast Blue RR [80 mg/mL]) para detectar la actividad esterasa. El gen positivo fue escindido del fago e introducido en la cepa de *E. coli* XL0LR para su expresión y estudio como biocatalizador. En la caracterización enzimática se utilizaron diversos ésteres de *p*-nitrofenol (*p*NP-acetato, *p*NP-butirato, *p*NP-laurato, *p*NP-palmitato, *p*NP-octanoato, *p*NP-decanoato y *p*NP-dodecanoato) para determinar la longitud del grupo acilo preferente por el biocatalizador. Una vez determinado el sustrato, se evaluaron los perfiles de pH (de 5 a 12) vs. actividad. También se evaluó su

estabilidad frente a inhibidores como el detergente Tritón X-100 y el solvente acetonitrilo (ambos en concentraciones de 1% a 5% v/v).

Resultados. Se obtuvo una genoteca de 14,000 *pfu* con un tamaño de 112 Mpb, encontrándose una variante con actividad esterasa positiva denominada EstCP1 (figura 1).



Fig. 1. Cultivo en placa con medio LB con la cepa XL0LR sin inserto (izquierda) y la XL0LR con el inserto de EstCP1. La coloración café indica la actividad esterasa positiva.

La caracterización enzimática se realizó utilizando células completas como biocatalizador. Para su preparación, las células fueron lavadas y deshidratadas. El biocatalizador presentó actividad sólo frente a ésteres de cadena corta (*p*NP-acetato y *p*NP-butirato) descartando la actividad lipasa. Para llevar a cabo la evaluación del perfil de pH vs. actividad, se seleccionó como sustrato al *p*NP-butirato. El biocatalizador EstCP1 presentó mayor actividad en el rango de pH de 8 a 9. Al analizar su comportamiento frente a los inhibidores, se observó disminución de actividad a partir del 5% (v/v) en ambos casos.

Conclusiones. El presente trabajo explora con técnicas metagenómicas, el potencial funcional de los alimentos fermentados y corrobora que son de gran importancia como fuentes regionales de enzimas. El biocatalizador EstCP1 procedente del metagenoma del pozol presenta actividad esterasa y tiene actividad a pH elevados. Es importante continuar evaluando su potencial con mayor profundidad para valorar su posible aplicación en procesos biotecnológicos.

Agradecimiento. Al IBQ Francisco Sánchez Enríquez y a CONACyT por la beca No. 230603, otorgada para la realización del trabajo.

Bibliografía.

- (1) Handelsman J. 2004. *Microbiol Mol Biol R. Dec.* p.669-685.
- (2) Wachter C., Cañas A. 1993. *World J Microb Biot.* Vol. 9 pp. 269-274.
- (3) Reyes-Duarte, D., Polaina, J., Cortés-López, N., et. al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 7553–7557.