Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.

Año 2017 Volumen 21 Número 2
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería

Revista de la Sociedad Mexicana de
Biotecnología
y Bioingeniería A.C.

MESA DIRECTIVA

Dr. Carlos Regalado González
Presidente

Dr. Adelfo Escalante Lozada
Vice-Presidente

Dr. Nicolás Oscar Soto Cruz
Secretario

Dr. Aldo Amaro Reyes
Tesorero

Dra. Sylvie Leborgne
Subsecretario

Dra. Blanca García Almendarez
Vocal Profesional

Ing. Diana Victoria Melo Sabogal
Vocal Estudiante

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Editora en Jefe
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
CINVESTAV

Dr. Fernando Luis García Carreño
CIBNOR

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
UAM-I

Dra. Sara Solís Pereira
Instituto Tecnológico de Mérida

Dra. Elizabeth Langley McCarron
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Víctor Manuel Loyola
Centro de Investigación Científica de Yucatán

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM). Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título04-1999-082516265000-101. Los Conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Del. Tlalpan, México, D.F. o a la siguiente dirección electrónica smbb1982@gmail.com

Índice

EDITORIAL

Los jóvenes como prioridad: un reto de la SMBB

Manuel Alejandro Lizardi Jiménez **4**

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES **6**

PREMIOS ALFREDO SÁNCHEZ MARROQUÍN

MAESTRÍA:

Retos en la producción de lacasas fúngicas en cultivo sumergido: estrés hidrodinámico vs. transferencia de oxígeno

Karen Ibeth Fernández-Alejandre, Leobardo Serrano-Carreón **11**

DOCTORADO:

Lo que nos revela la metagenómica sobre la taxonomía y el potencial metabólico del consorcio bacteriano responsable de la maduración del queso Cotija

Alejandra Escobar-Zepeda, Maricarmen Quirasco **28**

Liberación y concentración de la actividad amilolítica de *Streptococcus infantarius* 25124 aislada del pozol

Carolina Rodríguez-Saavedra, Romina Rodríguez-Sanoja, Carmen Wacher y Gloria Díaz-Ruiz **58**

Los jóvenes como prioridad: un reto de la SMBB

La actividad científica y tecnológica del país enfrenta uno de sus periodos de crisis económica más fuerte de los últimos tiempos. Los recortes presupuestales implementados por el gobierno federal han afectado todos los ámbitos del quehacer científico. La cantidad de proyectos aprobados para los diferentes fondos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) incluyendo la formación de recursos humanos se vio limitada. El número de becas asignadas a los jóvenes estudiantes en los programas de posgrado del Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) se congeló. Dada la crisis presupuestal era fácil prever la reducción de los apoyos para financiar los proyectos de trabajo, incluyendo no solo la compra de reactivos o equipamiento básico sino incluso apoyos para movilidad o asistencia a reuniones científicas para investigadores y estudiantes. La situación y disponibilidad presupuestal para Universidades, Tecnológicos, Centros de Investigación y otras instituciones no es distinta.

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB), su mesa directiva nacional (MDN), sus comisiones, los socios numerarios y profesionales, como individuos críticos e informados deberíamos ser conscientes de esta realidad y proteger, como tema prioritario, la participación de los jóvenes estudiantes en las labores de difusión de nuestra interdisciplina, particularmente en el XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería celebrado del 25 al 30 de junio de 2017 en Puerto Vallarta.

La era digital/virtual nos permitió por primera vez no erogar el gasto en la impresión del programa, tampoco se entregó algún dispositivo de almacenamiento, por ejemplo, una memoria USB. La calidad de la bolsa entregada a los congresistas por su sencillez debió resultar muy económica. Es decir, hubo ahorros y economías suficientes. Sin embargo, dichas economías no se vieron reflejadas en apoyos realmente importantes para que los estudiantes pudieran asistir.

La SMBB enfrentó, según informe del Vicepresidente de la Sociedad, Dr. Adelfo Escalante Lozada, una de las peores asistencias estudiantiles en la historia de su congreso. De los 900 asistentes al congreso solo el 55 % fueron estudiantes, es decir 495. Una reducción de casi el 40 % de asistentes estudiantes con respecto al congreso anterior. De hecho para encontrar números tan bajos nos tenemos que remontar hasta el X Congreso, en 2005.

Son los jóvenes estudiantes, que, con su inteligencia y entusiasmo, renuevan y vigorizan las sociedades, la SMBB no es la excepción. La calidad de los trabajos presentados y la agudeza con la que los muchachos y muchachas participaron dieron cuenta de que la juventud acompaña a la SMBB. No podemos permitir que eso cambie.

En ese contexto, no es fácil olvidar que la MDN 2012-2014 entregó un superávit de casi 2 millones de pesos, según citó el Dr. Escalante en la clausura del XVII Congreso y que al inicio de 2017 solo había alrededor de 500, 000.00 pesos y eso con compromisos de pago. En curso una auditoría y revisión de cuentas, pero el no haber apostado por apoyos decididos a los estudiantes como tema prioritario nos privó, según la tendencia histórica hasta antes de este congreso de la asistencia de unos 300 estudiantes.

Se deben revisar las prioridades del destino de los recursos tan arduamente ganados. Tenemos el orgullo de que en esencia la SMBB es autogestiva y que en realidad vive de lo que los socios aportamos y que los socios estudiantes son una de las mayores prioridades. Establecer una especie de “algoritmo” que nos indique de acuerdo a los recursos con que se cuente los topes máximos en actividades de promoción de la MDN y viajes. Establecer en ese mismo “algoritmo” una partida destinada a apoyar la asistencia de los estudiantes al congreso, becas a los mejores trabajos y descuentos grupales, y no solo eso, apoyar los eventos que las distintas sociedades estudiantiles realizan.

Nuestros jóvenes socios lo merecen.

Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez

CONACYT-Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca

Miembro de la Comisión de Premios de la SMBB 2014-2018

Guía de Autores

La revista puede recibir trabajos de investigación original así como de revisión en los campos de la biotecnología y bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

Los idiomas de la revista son el Español y el Inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Se recomienda que los trabajos completos tengan un máximo de 25 páginas, escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones de trabajos originales y revisiones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml, µl), de peso (kg, g, mg, µg), DNA, RNA y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde sus aspectos fundamentales hasta las aplicaciones de los mismos, incluyendo: microbiología, bioquímica y biología molecular, procesos y proyectos, así como biotecnología marina y biotecnología aplicada a la salud, alimentos, agricultura, veterinaria, enzimas y ambiente.

Los trabajos de investigación original serán divididos en las siguientes secciones: **Introducción**, **Materiales y métodos**, **Resultados**, **Discusión**, **Referencias y Agradecimientos**. Las secciones de Resultados y Discusión pueden presentarse combinadas.

Los trabajos de revisión incluirán el tema y subtemas que a juicio de los autores sean necesarios para la mejor presentación de la información. Estos trabajos pueden cubrir los siguientes contenidos:

1. ¿Qué es y para qué sirve la Biotecnología?. Es decir: descripciones que ilustren y divulguen los distintos campos de la biotecnología, sus alcances y limitaciones, su historia y sus perspectivas.

2. Las fronteras de la biotecnología: revisiones de nuevos campos o nuevas aplicaciones de la biotecnología. Por ejemplo: las perspectivas del uso de los genomas para el desarrollo de nuevas drogas o para el tratamiento de enfermedades metabólicas. Las perspectivas de la genómica (estudio sistemático de los genes y sus aplicaciones), la proteómica (predicción de la expresión de los genes en proteínas funcionales) y la fenómica (predicción de fenotipos o conductas de los organismos, en base a sus genes y a sus proteínas). El uso de la ingeniería genética para hacer ingeniería metabólica. Los nuevos tipos de reactores biológicos y los fenómenos de transporte implicados. Los nuevos esquemas de reacción, separación y control en procesos biotecnológicos.

3. Aplicaciones de la Biotecnología para resolver problemas o atender necesidades de la sociedad, con especial atención a sus aplicaciones ya vigentes en México. Esta sección será dedicada a una empresa o institución (pública o privada) que desee difundir los logros obtenidos en algún campo de la biotecnología. Por ejemplo: empresas productoras de antibióticos o productos biológicos, empresas de ingeniería ambiental que usen procesos biotecnológicos, empresas agropecuarias, forestales o de acuacultura que usen tecnologías biológicas avanzadas, o empresas de transformación de alimentos que utilicen enzimas, cultivos de microorganismos, etc. Esta lista es indicativa pero no exhaustiva.

4. Problemas de bioseguridad, bioética y biodiversidad relacionados con las aplicaciones de la biotecnología a la sociedad. Por ejemplo: análisis y comentarios sobre los debates acerca del uso de semillas transgénicas, los problemas de conservación y explotación de la biodiversidad mediante la biotecnología, los riesgos del uso de organismos transgénicos en diversos campos de la industria, los problemas de bioseguridad del uso de antibióticos y otros productos biotecnológicos.

5. La educación, la cultura y la difusión tecnológica en relación con la biotecnología. Por ejemplo: comentarios de planes y programas, de estilos y necesidades de la enseñanza, del enfoque interdisciplinario, en carreras o planes de estudio directamente ligados con la biotecnología. También necesidades y modalidades sobre programas de extensión educativa para la industria, para el público consumidor o para grupos selectos de personas interesadas en la biotecnología (políticos, funcionarios de empresas, líderes de opinión). El uso de la informática en la difusión de la biotecnología, y en general, el análisis de necesidades, métodos y alternativas para difundir los conocimientos de la biotecnología.

6. Oportunidades y propuestas para mejorar la cooperación y el desarrollo biotecnológicos. Por ejemplo: Análisis de las oportunidades vigentes de intercambio académico o comercial en biotecnología. Propuestas de nuevas formas de cooperación entre los sectores de investigación y la industria biotecnológica. Análisis y propuestas del uso óptimo de recursos humanos, financieros o materiales para mejorar la cooperación o el desarrollo de la biotecnología. En esta sección se dará espacio a los análisis, críticas o propuestas de los aspectos legales y fiscales que afecten e incluso puedan mejorar el desarrollo de la biotecnología en

México. Tales como: la propiedad industrial, el régimen fiscal de las empresas, el costo del desarrollo biotecnológico y los subsidios o estímulos económicos para el desarrollo de la biotecnología.

Tanto los trabajos de investigación original como las revisiones deberán apegarse al siguiente formato:

1. El título del manuscrito será puesto en **negritas** con letra Arial o equivalente tamaño **14**. El título deberá estar centrado.

2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño **12**. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como el e-mail del autor corresponsal.

3. Se deberá añadir un **Resumen** de no más de 250 palabras en Español y un **Abstract** en Inglés de tamaño similar.

4. Se incluirán entre 3 a 6 **Palabras** clave: que permitan clasificar el artículo en una base de datos. Estas palabras deberán de incluirse en Español y en Inglés (**Key words**:).

5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste de pondrá como primera línea en cursivas con letra Arial o equivalente tamaño **10**. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño **10**. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.

6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras. La impresión de las figuras e imágenes se hará en blanco y negro, por lo que se recomienda que muestren un buen contraste, en especial las figuras con varias líneas. Según el orden de aparición en el texto, las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto pero se anexarán en hojas separadas después de las **Referencias**.

7. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a tal fuente de información original, si ello fuera necesario. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: “Martínez & García (1999) han demostrado que...”, o bien, “Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...”. Si la cita posee varios autores se escribira como sigue: “Gutiérrez et al. (2003), han demostrado….” O bien: “Datos recientes (Gutiérrez et al., 2003) han mostrado…” Si la cita es es una página de Internet, ésta deberá ponerse completa entre paréntesis directamente en el texto donde se mencione. La lista de **Referencias** se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño **10**) de acuerdo al siguiente formato:

Para revistas:

García-Carreño F, Cota K & Navarrete del Toro MA (2008) Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp, Penaeus vannamei: conversion, characterization of catalytic properties, and role in postmortem melanosis. J. Agric. Food Chem. 56: 6454-6459.

Para libros y capítulos de libros:
(Libro)

Ullrich M (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press, Norwich.

(Capítulo de libro)

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB). Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

Para patentes:

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor-antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

Para congresos y reuniones: Se aceptarán un máximo de dos citas de este tipo.

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solis S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del Complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de Aspergillus HL. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

Para citas provenientes de internet: Se aceptará un máximo de dos citas de este tipo.

Van Deuren J, Wang Z & Ledbetter J (1997) Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 3ª Ed. Technology Innovation Office, EPA. Disponible en: http://www.epa.gov/tio/ remed.htm. Revistas electrónicas: Sun J, Lu X, Rinas U, & Zeng AP (2007) Metabolic peculiarities of Aspergillus niger disclosed by comparative metabolic genomics. Genome Biol. 8: R182. BioTecnología, Año 2015, Vol. 19 No. 1 11.

Para tesis de pre y posgrado:

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de Ditaxis heterantha para la Producción de safranal. Tesis de Maestra en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-78.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea. Las citas de internet, congresos y reuniones, deberán evitarse al máximo.

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos. Los trabajos solamente se reciben vía correo electrónico al Comité Editoral encabezado por la Dra. Romina Rodríguez Sanoja en la dirección romina@biomedicas.unam.mx Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor corresponsal, por lo que se pide Incluir una dirección de correo electrónico para este fin, así como para mantener comunicación con el editor sobre la evolución de la revisión y sobre la aceptación del mismo.

Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, el trabajo se publicará en línea y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC http://www.smbb.com.mx/.

TRABAJO GANADOR DEL PREMIO ALFREDO SÁNCHEZ MARROQUÍN, CATEGORÍA MAESTRÍA

Retos en la producción de lacasas fúngicas en cultivo sumergido: estrés hidrodinámico vs. transferencia de oxígeno

Karen Ibeth Fernández-Alejandre, Leobardo Serrano-Carreón*

Depto. de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos.

e-mail leobardo@ibt.unam.mx

RESUMEN

Las lacasas fúngicas son enzimas multicobre oxidasas capaces de degradar una amplia variedad de compuestos aromáticos que, a pesar de tener aplicaciones muy prometedoras en diversos sectores industriales, han tenido un impacto limitado por los bajos rendimientos en su producción a gran escala. Esta revisión reúne literatura relevante sobre los métodos de producción y optimización de estas enzimas, así como los retos propios del tanque agitado en la optimización del cultivo de hongos filamentosos para la producción de lacasas. A pesar de haber estudios que evalúan su efecto, el papel de la agitación en la producción de lacasas no ha sido del todo comprendido, pues la mayoría de los autores asumen que su influencia es simplemente mecánica y que los esfuerzos cortantes generados son los responsables de la disminución en la producción de lacasas. No obstante, estudios recientes muestran una interesante relación entre la energía disipada, la concentración de oxígeno disuelto, la producción de las lacasas, el crecimiento y la morfología de los basidiomicetos, que podría dar paso a nuevas estrategias de optimización en la producción de lacasas.

Palabras clave: lacasas, estrés hidrodinámico, oxígeno disuelto, morfología

ABSTRACT

Fungal laccases are multicopper oxidases enzymes able to degradate a wide range of aromatic compounds; however, low yields at commercial scale for laccase production had limited their promising applications in many industrial sectors. This review summarizes relevant literature on the different production methods and optimization strategies, as well as the STR optimization challenges in filamentous fungal cultures in order to increase laccase yield. Despite having several studies addressing this subject, the agitation role in laccase production has not been fully understood, since most authors assume that agitation effects are only mechanical, arguing that low yields only could be related with shear stress phenomenon. Nevertheless, recent studies show an interesting relationship between dissipated energy, dissolved oxygen tension, laccase yield, growth and basidiomycete morphology. This knowledge could break out into new strategies in laccase production optimization.

Key words: laccases, shear stress, dissolved oxygen, fungal morphology

LACASAS

Las lacasas (*p*-difenol: oxígeno-oxidorreductasas EC 1.10.3.2) son glicoproteínas pertenecientes a la familia de las polifenol oxidasas, con peso molecular entre 50 y 130 kDa, que catalizan la reducción de oxígeno a agua acompañada de la oxidación de compuestos fenólicos (Thurston, 1994). Típicamente, las lacasas están presentes en hongos de pudrición blanca y plantas, aunque también se les ha identificado en algunas bacterias, insectos, líquenes y esponjas (Mate & Alcalde, 2016). Estas enzimas desempeñan funciones tan diversas como la síntesis de lignina en las plantas, la esclerotización de las cutículas de la epidermis en algunos insectos, así como confiriendo resistencia a factores físicos en esporas y participando en la morfogénesis de bacterias (Eggert et al., 1996; Alexandre & Zhulin, 2000; Hatakka, 2001; Lang et al., 2012). No obstante, las lacasas fúngicas son las que tienen mayor número de funciones, participando en la morfogénesis, patogénesis, síntesis de pigmentos, esporulación y siendo los componentes más importantes del complejo enzimático responsable de la degradación de la lignina en los hongos de pudrición blanca (Thurston, 1994; Gianfreda et al., 1999; Alcalde, 2007, Morozova et al., 2007).

Debido a la compleja estructura polimérica aleatoria de fenilpropanoatos de la lignina, las lacasas fúngicas encargadas de degradarla, son capaces de oxidar una amplia variedad de sustratos aromáticos (Janusz et al., 2013), lo cual confiere a estas enzimas una gran cantidad de aplicaciones biotecnológicas. Entre las aplicaciones más importantes figuran la delignificación del papel, (Virk et al., 2012), degradación de colorantes para la industria textil (Wesenberg et al., 2003), degradación de herbicidas (Chan et al., 2014), degradación de químicos residuales de la industria farmacéutica (Toushik et al., 2017), procesamiento de frutas y vegetales (Yin et al., 2017), clarificación y mejoramiento sensorial de bebidas (Lettera et al., 2016), así como la fabricación de sensores para la determinación de polifenoles (Gomes et al., 2004), entre muchas otras.

MÉTODOS DE PRODUCCIÓN

En la producción de lacasas fúngicas se han utilizado dos técnicas generales de cultivo a nivel industrial: cultivo en estado sólido y cultivo sumergido. Las fermentaciones de estado sólido (SSF) se caracterizan por el crecimiento en un sustrato sólido inerte o natural, en ausencia o semi-ausencia de líquido libre (Pandey et al., 1999); suelen emplear residuos agroindustriales como sustratos, con la finalidad de proveer nutrientes al microorganismo dando valor agregado a los residuos (Pandey et al., 2000; Rodríguez et al., 2002). No obstante, este método resulta inconveniente cuando la finalidad es obtener las enzimas a gran escala debido a la dificultad en el monitoreo y control de parámetros como la transferencia de

oxígeno y la agitación, que pueden tener repercusiones importantes en el cultivo de hongos filamentosos (Rodríguez et al., 2002). Al parecer el tipo de cultivo empleado afecta al tipo de lacasas (isoformas) que se producirán en los cultivos de basidiomicetos. Castanera et al. (2012) reportaron la expresión diferenciada del 42 % de los genes que codifican para lacasas de *Pleurotus ostreatus*, hallando que el cultivo sumergido favoreció incrementos en la expresión del 38 % de estos genes, mientras que el cultivo de estado sólido únicamente favoreció al 4 % de ellos. Los autores sugirieron que el factor más relevante había sido el bajo contenido de agua en los cultivos de estado sólido, que podría haber afectado la difusión de los sustratos e inductores utilizados hacia el hongo.

El cultivo sumergido presenta ventajas con respecto al cultivo de estado sólido, pues permite mantener homogeneidad en el medio, controlar con mayor precisión las condiciones de cultivo necesarias para producir metabolitos específicos y disminuir problemas de transferencia de oxígeno y nutrientes, así como el riesgo de contaminación. Además, el cultivo sumergido acorta tiempos de cultivo, facilita la separación, purificación y producción de lacasas a gran escala, por lo que es considerada la técnica preferida para producir estas enzimas (Fazenda et al., 2008). En algunos casos, la inmovilización de células en el cultivo sumergido ha resuelto problemas de transferencia de masa y oxígeno en cultivos de alta viscosidad (Brijwani et al., 2010), lo que presenta mayores ventajas.

OPTIMIZACIÓN DE PRODUCCIÓN DE LACASAS EN CULTIVO SUMERGIDO

Los estudios realizados en la última década muestran un panorama muy alentador en la aplicación de las lacasas en una gran cantidad de áreas de consumo; sin embargo, la mayor parte de la investigación aplicada se realiza aún a una escala de laboratorio. Para contar con aplicaciones escalables y sustentables resulta indispensable incrementar la eficiencia de estas aplicaciones y los rendimientos en la producción de estas enzimas para producirlas en grandes cantidades (Shraddha et al., 2011; Silvério et al., 2013; Mate & Alcalde, 2016; Yang et al., 2017).

Existe una gran cantidad de estrategias que se han implementado con la finalidad de optimizar la producción de lacasas fúngicas. Entre las principales estrategias reportadas se encuentran el uso de inductores como el cobre o compuestos aromáticos, cuya adición al cultivo incrementa la concentración de lacasas específicas (Robene-Soustrade & Lung-Escarmant, 1997); la limitación de sustratos como el carbono y el nitrógeno (Brijwani et al., 2010); la adición de micropartículas insolubles e inertes, que favorecen la disminución en el tamaño y densidad de los *pellets* eliminando limitaciones nutricionales (Antecka et al., 2016), y la producción heteróloga en bacterias, levaduras y hongos filamentosos, que hasta el momento ha presentado problemas de estabilidad llegando a actividades enzimáticas aún menores que con la cepas nativas (Yang et al., 2017). Dentro de las estrategias de optimización, no podemos

dejar de mencionar la manipulación de las variables de proceso, que constituye la técnica clásica para la optimización de cultivos de basidiomicetos, y suele ser el primer conjunto de pasos a realizar antes de incluir cualquiera de las técnicas mencionadas anteriormente. Entre las variables de proceso, frecuentemente manipuladas con tal fin, se encuentran el pH, la relación C/N, temperatura, flujo de aireación, tensión de oxígeno disuelto, velocidad de agitación y potencia volumétrica.

Sea cual sea la estrategia a implementar, cuando se pretende llevar a cabo la optimización de un proceso de esta naturaleza, resulta fundamental conocer cómo es que el entorno que les estamos imponiendo al hongo, afecta su fisiología y al producto o productos que deseamos obtener de ellos, en este caso a la síntesis de lacasas. Mientras más se conozcan a detalle estos efectos se podrán proponer metodologías más eficientes y se incrementará la probabilidad de éxito en la implementación de las tecnologías resultantes. La optimización de cultivos fúngicos puede llegar a tomar mucho tiempo si no se emplean estrategias y consideraciones adecuadas. Cuando se trata de optimizaciones que requieren incluir varios parámetros, resulta adecuado estudiarlos en conjunto; para ello se recomienda emplear herramientas como el diseño de experimentos (DOE, por sus siglas en inglés). Este tipo de diseños permiten conocer, además del efecto individual de cada uno de los factores de estudio, los efectos combinados o interacciones entre parámetros que pueden influir de manera inesperada en la producción de lacasas, y que no podría ser posible conocer en estudios donde se evalúa el efecto de un parámetro a la vez (Tinoco-Valencia et al., 2014).

CULTIVO SUMERGIDO. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE LACASAS

En los procesos de optimización de basidiomicetos para la producción de lacasas en cultivo sumergido generalmente se evalúa el efecto de los parámetros manipulables en el biorreactor, como el pH, temperatura, flujo de aireación y velocidad de agitación. Los valores óptimos dependerán de cada especie fúngica evaluada y pueden llegar a variar de una cepa a otra. El pH óptimo oscila entre valores de 4.5 y 6 (Thurston, 1994), el rango de temperatura está entre 25 y 30 °C (Pointing & Vrijmoed, 2000), los flujos de aireación entre 0.1 y 1 vvm (Fenice et al., 2003; Tinoco-Valencia et al., 2014) y velocidades de agitación entre 100 y 180 rpm (Tavares et al., 2006; Birhanli & Yesilada, 2010).

MORFOLOGÍA

Existen otros factores propios del crecimiento miceliar que interfieren en la eficiencia de los cultivos sumergidos. A nivel macroscópico el cultivo puede generar una morfología filamentosa de micelio disperso o formar agregados compactos de hifas con forma semiesférica denominados pellets (Papagianni, 2004). La morfología desarrollada dependerá de las condiciones ambientales del fermentador (la composición del medio, pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, viabilidad de esporas,

concentración de inóculo y estrés mecánico) (Deckwer et al., 2006; Krull et al., 2010), y la morfología dominante del hongo será la que dicte en gran medida las condiciones fisico-químicas del cultivo (Gibbs et al., 2000).

Cuando los hongos crecen en forma de micelio disperso, el incremento en la concentración de biomasa genera un aumento en la viscosidad del medio adquiriendo un comportamiento pseudoplástico debido a las interacciones entre los filamentos suspendidos. Este cambio de comportamiento puede resultar en una transferencia pobre de oxígeno en las regiones alejadas de los impulsores (donde las fuerzas de corte son más débiles y la viscosidad es mayor), así como en un daño celular por el estrés de corte generado en las regiones de barrido de los impulsores (Wittler et al., 1986; Riley et al., 2000; Gabelle et al., 2012). En cambio, la morfología de tipo pellet favorece la obtención de caldos mucho menos viscosos ya que los pellets generalmente se comportan como esferas y ejercen menos influencia en las propiedades reológicas del medio (Metz et al., 1979).

En fermentaciones a gran escala, la morfología de pellets es la más conveniente ya que los costos energéticos, para mantener un mezclado eficiente que asegure la homogeneidad de los cultivos, son mucho menores cuando se trata de fluidos poco viscosos (Gibbs et al., 2000). No obstante, hay que considerar que a medida que los pellets aumentan de tamaño durante la fermentación, la limitación difusional de sustratos y oxígeno al interior de los mismos puede afectar su viabilidad y productividad (Cui et al., 1997; Grimm et al., 2005; Zmack et al., 2006; Krull et al., 2013). Lo más conveniente sería obtener pellets pequeños, de modo que su viabilidad y la producción específica de metabolitos se incrementaran. Una de las formas más prácticas de obtener pellets de menor tamaño es intensificando la potencia disipada en los cultivos, ya sea con aumentos en la velocidad de agitación, sustitución del tipo de turbina o incrementando los flujos de aireación. No obstante, a medida que se aplica más potencia mayor es la probabilidad de ocasionar un estrés hidrodinámico en el hongo que podría poner en riesgo su supervivencia y productividad. Así lo reportan Márquez-Rocha et al. (1999) quienes, tras disminuir el diámetro de los pellets de *Pleurotus ostreatus* mediante el incremento en la velocidad de agitación (de 200 a 400 rpm) y de flujo de aireación (de 0.5 a 1.5 vvm) en un 20 y 19%, respectivamente, no lograron incrementar la velocidad de crecimiento del hongo, disminuyendo el valor de μ (h^{-1}) en un 22 y 17 %, respectivamente. Sin embargo, sustituyendo las turbinas Rushton por InterMig (aplicando menor potencia), obtuvieron pellets 35% más pequeños e incrementaron la velocidad de crecimiento del hongo en un 13 %. Por su parte, Antecka et al. (2016) emplearon la técnica MPEC (micro-particle enhanced cultivation por sus siglas en inglés) utilizando micropartículas de Al_2O_3 para reducir el tamaño de los pellets, logrando incrementar la producción de lacasas en *Pleurotus sapidus* y *Cerrena unicolor* 2 y 3.5 veces, respectivamente.

AGITACIÓN

La agitación es uno de los parámetros de proceso más importantes en el cultivo de microorganismos, puesto que debe cumplir con dos funciones principales: a) llevar a cabo la dispersión del aire para asegurar una adecuada transferencia de oxígeno al medio de cultivo; y b) un mezclado eficiente del caldo de cultivo con el fin de minimizar los gradientes de temperatura, pH y concentración de nutrientes. En el caso de los cultivos con hongos filamentosos, la agitación también puede afectar de manera considerable al crecimiento y la morfología del hongo, pues genera esfuerzos de corte que pueden ocasionar daños en la pared celular, además de la erosión y fragmentación de los pellets (Amanullah et al., 2000; Rocha-Valadez et al., 2005), y que puede repercutir finalmente en la velocidad de crecimiento y la síntesis de metabolitos de interés (Papagianni et al., 2004; Serrano-Carreón et al., 2015). Como resultado del efecto global de la agitación, tanto el crecimiento del hongo como la producción de metabolitos depende de las complejas interacciones entre la hidrodinámica, la transferencia de oxígeno y la morfología miceliar (Serrano-Carreón et al., 2015).

En diversos estudios se ha tratado de conocer y entender el efecto de la agitación sobre la producción de lacasas; sin embargo, se han reportado resultados que han llegado a causar controversia al respecto. Por una parte, Silvério et al. (2013) y Hess et al. (2002) observaron que la producción de lacasas disminuía al pasar de cultivos en matraz a tanque agitado; Fenice et al., (2003) observaron que a velocidades mayores de 250 rpm las actividades máximas de lacasa disminuían drásticamente en tanque agitado. Por su parte, Tavares et al. (2006) no encontraron efecto alguno sobre la producción de lacasas de *Trametes versicolor* entre 100 y 180 rpm. Algunos otros observaron un comportamiento de tipo campana y reportan niveles óptimos de agitación que favorecen la producción de lacasas; así, el óptimo para *Trametes versicolor* resultó ser 150 rpm (Birhanli & Yesilada, 2010), y para *Dichomitus squalens* 250 rpm (Babic & Pavko, 2012). Cabe mencionar que en todos los casos se había asumido de manera generalizada que la disminución en la producción de lacasas, suscitada por el incremento en la intensidad de la agitación, se debía a los esfuerzos de corte generados por los impulsores en un fenómeno conocido como estrés hidrodinámico.

Debido a la naturaleza diversa de los hongos basidiomicetos, es difícil generalizar su comportamiento en respuesta a la intensidad de agitación. Además de los esfuerzos de corte, se encuentran los efectos del mezclado y la transferencia de oxígeno, particularmente cuando los caldos adquieren un comportamiento pseudoplástico. No obstante, en ninguno de los trabajos realizados se había estudiado de manera independiente el efecto que ejerce la agitación sobre la concentración de oxígeno disuelto en el medio como para atribuir el efecto de la agitación sólo al estrés hidrodinámico generado (Fernández-Alejandre et al., 2016).

ESTRÉS HIDRODINÁMICO VS TRANSFERENCIA DE OXÍGENO

En pocas ocasiones se ha señalado la necesidad de separar los efectos mecánicos de la agitación, de aquellos relacionados con la transferencia de oxígeno; Cui et al. (1998) lo consideraron necesario para entender el efecto de la agitación sobre la morfología de *Aspergillus awamori*. En 1996, Gibbs & Seviour realizaron un estudio para determinar si la influencia en la producción de exopolisacáridos en *Aureobasidium pullulans* estaba dada por los esfuerzos mecánicos sobre el micelio o por la concentración de oxígeno del medio. Cuando incrementaban la velocidad de agitación de 250 a 1000 rpm notaban que la producción específica del exopolisacárido disminuía; mientras la mayoría de los investigadores de la época atribuían este efecto al estrés mecánico, ellos comprobaron, a través del control de la tensión de oxígeno disuelto (TOD), que el oxígeno era el responsable principal de la disminución del exopolisacárido.

Rocha-Valadez et al. (2007) utilizaron una estrategia similar para estudiar el efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre la fisiología de *Trichoderma harzianum* en la producción de 6-pentil-α-pirona implementando un sistema de fermentación que permitía controlar la TOD por mezcla de gases, así como mantener un suministro de potencia constante durante los cultivos (EDCF).

La EDCF (kW/m^{3}s) es el producto de la disipación específica de energía y la frecuencia de circulación de partículas en la zona de descarga de los impulsores. La conveniencia de utilizar la EDCF como parámetro de estudio radica en su efectividad para relacionar la fisiología de las especies fúngicas, así como su morfología, con las condiciones operaciones del biorreactor en cultivo sumergido (Amanullah et al., 2000; Casas López et al., 2005; Rocha-Valadez et al., 2005; Serrano-Carreón et al., 2015).

Tinoco-Valencia et al. (2014) estudiaron los efectos de las condiciones hidrodinámicas en cultivos sumergidos de *Pleurotus ostreatus* CP50 a diferentes velocidades iniciales de disipación de energía (0.9– 5.9 kW/m^{3}s) y flujos de aireación (0.1 – 0.5 vvm). Los resultados revelaron que el crecimiento del hongo se favorece significativamente a altas velocidades de agitación (5.9 kW/m^{3}s) y altos flujos de aireación (0.5 vvm). Sin embargo, se encontró que estas condiciones de alta agitación y aireación afectaron negativamente a la producción específica de lacasas (α, U/g$_x$). Cabe mencionar que, en este estudio no se controlaron ni la potencia aplicada a los cultivos ni la concentración de oxígeno disuelto (TOD), por lo que no fue posible determinar el efecto individual de cada parámetro.

TRANSFERENCIA DE OXÍGENO Y ESTRÉS OXIDATIVO EN EL CULTIVO DE BASIDIOMICETOS

La concentración de oxígeno disuelto es uno de los parámetros más importantes en el cultivo de hongos filamentosos aerobios a escala industrial. Con la finalidad de mejorar los procesos fermentativos y eliminar limitaciones nutricionales, a menudo el aire es

enriquecido con oxígeno con la intención de mantener la concentración de oxígeno disuelto por arriba de una concentración crítica, generalmente definida como aquella a la cual la velocidad específica de crecimiento es el 95% de la velocidad máxima.

En el metabolismo celular normal, durante la respiración, una molécula de oxígeno es progresivamente reducida a dos moléculas de agua a través de una secuencia de procesos univalentes. Mientras esta secuencia es llevada a cabo, la reducción incompleta da lugar a la formación de radicales que aún son potentes oxidantes, como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$) (Dalton et al., 1999), radicales conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS). Ante la formación de ROS, las células activan mecanismos de defensa para disminuir la cantidad de estas especies tóxicas; sin embargo cuando los niveles de ROS exceden la capacidad antioxidante de las células, el microorganismo entra en un estado de deterioro denominado estrés oxidativo en el que ocurre daño al DNA, peroxidación de lípidos y daño a proteínas (Li et al., 2009). El estrés oxidativo puede manifestarse en los cultivos a través del incremento en la actividad de las enzimas SOD, CAT, LAC y GPx, cambios morfológicos, la disminución de la velocidad de crecimiento del hongo y de consumo de sustrato, así como en un bajo contenido de proteínas y de ATP (Li et al., 2011).

Algunos de los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo implican moléculas como el glutatión y enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasas (CAT), lacasas (LAC) y la glutatión peroxidasa (GPx) que convierten a los ROS en especies menos tóxicas o reactivas (Sigler et al., 1999; Penninckx, 2000; Ye et al., 2000; Li et al., 2009).

Otro de los mecanismos de regulación de ROS en hongos filamentosos involucra vías respiratorias alternas. Estas vías utilizan enzimas que sustituyen a complejos enzimáticos de la cadena de transporte de electrones, transfiriendo los electrones de manera más directa y disminuyendo la formación de ROS (Karaffa et al., 2001; Bai et al., 2003; Zhao et al., 2009; Voulgaris et al., 2012). Una de estas vías emplea a las NADH deshidrogenasas alternas que transfieren el electrón del NADH directamente a la ubiquinona, sustituyendo al complejo I. La otra vía conocida emplea una oxidasa alternativa (AOX) que transfiere electrones desde el ubiquinol hasta el aceptor final O_2 sin que estos se transfieran a los complejos III y IV. En ambos casos, las enzimas alternas omiten la translocación de protones hacia la matriz mitocondrial cuando los electrones son transferidos; en esos casos la síntesis de ATP no tiene lugar y la energía se disipa en forma de calor (Moore et al., 2002).

Cuando se opera en condiciones de enriquecimiento del aire con oxígeno, a medida que incrementa el flujo de oxígeno a través de la cadena respiratoria, se favorece la generación de ROS y las células son más propensas a presentar estrés oxidativo. Así lo observaron Kreiner et al. (2000) y Bai et al. (2003) con *Aspergillus niger* cuando, al enriquecer la aireación con oxígeno a un 25 %

(v/v), reportaron que la actividad SOD incrementaba. Sin embargo, a concentraciones mayores de oxígeno, (50, 75 y 100% (v/v)), observaron que la cantidad de proteína disminuía, al mismo tiempo que disminuían la cantidad de $O_2^{\bullet-}$ intracelular y la actividad SOD. Bai et al. (2003) comprobaron que una NADH deshidrogenasa se había activado para disminuir la generación de ROS; esto explicaba la disminución de la actividad SOD, pues al no generarse más ROS ya no era necesario activar los mecanismos de defensa. Por otro lado, la utilización de esta vía respiratoria alterna concordaba con la disminución de la cantidad de proteína, pues en esta vía la síntesis de ATP disminuye al no haber bombeo de protones hacia la matriz mitocondrial.

Es sabido que las altas concentraciones de oxígeno también pueden repercutir en la morfología de los hongos filamentosos, pues estos generalmente adoptan formas en las que el área expuesta al medio sea reducida, presentando la adhesión del micelio o formación de pellets más densos y lisos, de modo que las células del interior resistan a los altos niveles de oxígeno y el daño causado por las ROS se minimice (Kreiner et al., 2003; Bai et al., 2004).

Diversos estudios han demostrado la importancia de las enzimas ligninolíticas, como las lacasas, lignino peroxidasas y magnaneso peroxidasas, en la defensa contra el estrés oxidativo (Belinky et al., 2003; Jaszek et al., 2006; Zhao et al., 2009). No obstante, en ningún estudio se ha podido comprobar que la producción de estas enzimas se vea afectada por el estrés oxidativo causado por altas tasas de transferencia de oxígeno. En su trabajo con *P. ostreatus*, Fernández-Alejandre et al. (2016) propusieron que las altas concentraciones de oxígeno disuelto disminuyen la producción de lacasas debido a la posible activación de una vía respiratoria alterna que disminuye la generación de ROS, en comparación con concentraciones de oxígeno menores que favorecen la producción de lacasas. A continuación se presenta una reseña del estudio completo como caso de estudio.

Pleurotus ostreatus: ESTRÉS HIDRODINÁMICO VS. TRANSFERENCIA DE OXÍGENO

Haciendo uso del sistema de fermentación generado por Rocha-Valadez et al. (2007), recientemente Fernández-Alejandre et al. (2016) estudiaron por primera vez y de manera independiente los efectos hidrodinámicos y del oxígeno disuelto sobre la producción de lacasas de un hongo filamentoso.

Este trabajo realizado con la cepa *Pleurotus ostreatus* CP50, es el primero en reportar de manera detallada la relación que mantiene la producción específica de lacasas y el crecimiento de un hongo filamentoso con su morfología, la potencia disipada en un tanque agitado convencional, la concentración del oxígeno disuelto en el medio y el nivel de expresión de los genes correspondientes a las lacasas de esta especie.

El estudio se hizo a través de un diseño experimental factorial 3^2, donde los factores a evaluar fueron la EDCF (1, 11 y 21 kW/m^{3}s) y la TOD (8, 15 y 22%) sobre las

respuestas relativas a la producción específica de lacasas y expresión de *poxc* (correspondiente a la lacasa predominante, expresándose 100 veces más que *pox3*, también presente en los cultivos), diámetro de *pellet*, y velocidad de crecimiento de *P. ostreatus* CP50. Los resultados demostraron que, contrario a lo que se pensaba, el hongo no sufre estrés hidrodinámico bajo las condiciones de operación estudiadas (potencias mayores a las utilizadas en los cultivos convencionales de basidiomicetos), y es el oxígeno disuelto el factor con mayor impacto sobre el proceso general.

El oxígeno afectó negativamente la producción específica de lacasas, ejerciendo su efecto a nivel transcripcional sobre el gen *poxc* a concentraciones de oxígeno por arriba del 8 % de TOD. Estudios anteriores mostraban que los incrementos en el flujo de aireación ocasionaban la disminución de la actividad lacasa de *Paunus tigrinus* CBS 577.79, *Dichomitus squalens* y *Pleurotus ostreatus* CP50 (Fenice et al., 2003; Babic & Pavko, 2012; Tinoco-Valencia et al., 2014); sin embargo, no era posible estudiar el efecto del oxígeno debido a que no existía un control independiente de la potencia suministrada a los cultivos.

Por otro lado, el oxígeno influyó en la velocidad de crecimiento del hongo teniendo un efecto de tipo campana entre 8 y 22% de TOD. Se sabe que en fermentaciones aerobias el oxígeno puede tener efectos tóxicos para el microorganismo a presiones parciales no muy por encima de la del aire (Onken & Liefke, 1989). Los autores sugieren que el hongo podría estar activando una vía respiratoria alterna contra estrés oxidativo a nivel de la cadena de transporte de electrones utilizando alguna NADH deshidrogenasa u oxidasa no generadora de protones como se ha reportado en trabajos con *M. grisea*, *A. fumigatus* y *A. niger* (Yukioka et al., 1998; Magnani et al., 2007; Voulgaris et al., 2012) y que también se ha relacionado con la disminución del ATP producido en condiciones de enriquecimiento del aire con oxígeno (Li et al., 2008), y con la disminución en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Karaffa et al., 2001; Bai et al., 2003; Zhao et al., 2009). Se ha demostrado que la presencia de ROS induce la expresión de genes que codifican para enzimas ligninolíticas (Zhao *et* al., 2009). Fernández-Alejandre et al. (2016) señalan que el efecto negativo del oxígeno sobre la expresión de *poxc* en *Pleurotus ostreatus* podría deberse a una disminución en ROS resultante de la utilización de una vía respiratoria alterna.

La EDCF resultó ejercer efecto directo únicamente en el tamaño de los *pellets*, generando *pellets* de menor tamaño a medida que la energía disipada por la agitación incrementaba; por otro lado, al incrementar la energía disipada se favoreció la producción específica de lacasas. Tras considerar que la EDCF no afectó a la transcripción de *poxc* ni a la velocidad de crecimiento del hongo, los autores concluyen que la obtención de *pellets* menores disminuyó las limitaciones difusionales de oxígeno y nutrientes, con lo cual aumentó el porcentaje de biomasa activa en la capa externa del *pellet* y la producción específica de lacasas. Antecka et al. (2016) comprobaron que la disminución en el tamaño

y la densidad de los *pellets* de *Cerrena unicolor* y *Pleurotus sapidus* incrementó la producción de lacasas. Resultados similares se han visto para la producción de otras enzimas fúngicas (Wösten et al., 1991; Gordon et al., 2000; Hamanaka et al., 2001; El-Enshasy et al., 2006; Driouch et al., 2012).

Con base en los resultados obtenidos, se ha sugerido que los cultivos en fermentadores convencionales, sin control de la TOD ni de la EDCF, sean operados a altas velocidades de agitación y a bajos flujos de aireación de modo que se favorezca la formación de agregados miceliares pequeños, la producción específica de lacasas se maximice y el crecimiento del hongo no se vea afectado por las altas concentraciones de oxígeno disuelto.

CONCLUSIÓN

Las lacasas fúngicas son enzimas con gran potencial en una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas, pero en la mayoría de los casos su uso ha tenido un impacto limitado debido a las bajas productividades alcanzadas en los cultivos de hongos basidiomicetos a gran escala. A pesar de haber avances importantes en las diferentes formas de cultivar estos microorganismos a escala piloto, el cultivo sumergido sigue siendo el método de producción más utilizado a gran escala en la producción de estas enzimas. Con la finalidad de optimizar este tipo de cultivos e implementar estrategias novedosas en cultivo sumergido, es fundamental conocer con detalle cómo cada variable operacional afecta al proceso. Es necesario conocer la estrecha relación entre la hidrodinámica, la transferencia de oxígeno, la morfología y la producción de lacasas. Conocimientos recientes como el efecto del oxígeno y del estrés mecánico sobre el crecimiento de los basidiomicetos y la producción de lacasas contribuirán en la mejora de la planeación experimental de nuevas estrategias y permitirán realizar mejoras en los procesos de escalamiento de estos procesos.

REFERENCIAS

Alcalde M (2007) Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications. In: Industrial Enzymes. Structure, Function and Applications. Polaina J & MacCabe AP (eds). : Springer, NL. pp. 461–476.

Alexandre G & Zhulin B (2000) Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol.* 18(2):41-42.

Amanullah A, Jüsten P, Davies A, Paul GC, Nienow AW & Thomas CR (2000) Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. Eng. J.* 5:109-114.

Antecka A, Blatkiewicz M, Bizukojc M & Ledakowicz S (2016) Morphology engineering of basidiomycetes for improved laccase biosynthesis. *Biotechnol. Lett.* 38:667-672.

Babic J & Pavko A (2012) Enhanced enzyme production with the pelleted form of *D. squalens* in laboratory bioreactors using

added natural lignin inducer. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39:449-457.

Bai Z, Harvey LM & McNeil B (2003) Physiological responses of chemostat cultures of *Aspergillus niger* (B1-D) to simulated and actual oxidative stress. *Biotechnol. Bioeng.* 82:691-701.

Bai Z, Harvey LM, White S & McNeil B (2004) Effects of oxidative stress on production of heterologous and native protein, and culture morphology in batch and chemostat cultures of *Aspergillus niger* B1-D. *Enzyme Microb. Technol.* 34(1):10-21.

Belinky PA, Flikshtein N, Lechenko S, Gepstein S & Dosoretz CG (2003) Reactive oxygen species and induction of lignin peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6500-6506.

Birhanli E & Yesilada O (2010) Enhanced production of laccase in repeated-batch cultures of *Funalia trogii* and *Trametes versicolor. Biochem. Eng. J.* 52:33-37.

Brijwani K, Rigdon A & Vadlani PV (2010) Fungal laccases: Production, function, and applications in food processing. *Enz. Research.* 2010:149748

Casas López JL, Sánchez Pérez JÁ, Fernández Sevilla JM, Rodríguez Porcel EM & Chisti Y (2005) Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus. J. Biotechnol.* 116:61-77.

Castanera R, Pérez G, Omarini A, Alfaro M, Pisabarro AG, Faraco V, Amore A & Ramírez L (2012) Transcriptional and enzymatic profiling of *Pleurotus ostreatus* laccase genes in submerged and solid-state fermentation cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(11):4037-4045.

Chan W, Heredia G, Rodríguez R, Salmones D, Gaitán R & Alarcón E (2014) Response of ligninolytic macrofungi to the herbicide atrazine: dose-response bioassays. *Rev. Argent. Microbiol.* 46(4):348-357.

Couto SR & Toca-Herrera JL (2007) Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnol. Adv.* 25:558-569.

Cui YQ, van der Lans RG & Luyben KC (1997) Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 57:715-726.

Cui YQ, van der Lans RG & Luyben KC (1998) Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 57:409-419.

Dalton TP, Shertzer HG & Puga A (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:67-101.

Deckwer WD, Jahn D, Hempel DC & Zeng AP (2006) System biology approach to bioprocess development. *Eng. Life Sci.* 6(5):455-469.

Driouch H, Hänsch R, Wucherpfennig T, Krull R & Wittmann C (2012) Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: targeted morphology engineering using titanate microparticles. *Biotechnol. Bioeng.* 109(2):462-471.

Eggert C, Temp U & Eriksson KE (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification

and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Mirobiol*. 62:1151-1158.

El-Enshasy H, Kleine J & Rinas U (2006) Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. *Process Biochem.* 41:2103-2112.

Fazenda ML, Seviour R, McNeil B & Harvey LM (2008) Submerged culture fermentation of "higher fungi": the macrofungi. *Adv. Appl. Microbiol.* 63:33-103.

Fenice M, Sermani GG, Federici F & D'Annibale A (2003) Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive oil mill wastewater-based media. *J. Biotechnol.* 100:77-85.

Fernández-Alejandre KI, Flores N, Tinoco-Valencia R, Caro M, Flores C, Galindo E & Serrano-Carreón L (2016) Diffusional and transcriptional mechanisms involved in laccases production by *Pleurotus ostreatus* CP50. *J. Biotechnol.* 223:42-49.

Gabelle JC, Jourdier E, Licht RB, Chaabane F, Henaut I, Morchain J & Augier F (2012) Impact of rheology on the mass transfer coefficient during the growth phase of *Trichoderma reesei* in stirred bioreactors. *Chem. Eng. Sci.* 75:408-417.

Gianfreda L, Xu F & Bollag J (1999) Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Biorrem. J.* 3:1-25.

Gibbs PA & Seviour RJ (1996) Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:503-510.

Gibbs PA, Seviour RJ & Schmid F (2000) Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Crit. Rev. Biotechnol.* 20(1):17-48.

Gomes SA, Nogueira JM & Rebelo MJ (2004) An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. *Biosens. Bioelectron.* 20:1211-1216.

Gordon GL, Archer DB, Jeenes DJ, Doonan JH, Wells B, Trinci APJ & Robson GD (2000) A glucoamylase::GFP gene fusion to study protein secretion by individual hyphae of *Aspergillus niger*. *J. Microbiol. Methods* 42(1):39-48.

Grimm HL, Kelly S, Krull R & Hempel DC (2005) Morphology and productivity of filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:375-384.

Hamanaka T, Higashiyama K, Fujikawa S & Park EY (2001) Mycelial pellet intrastructure and visualization of mycelia and intracellular lipid in a culture of *Mortierella alpine*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:233-238.

Hatakka A (2001) Biodegradation of lignin. In: Biopolymers, Vol. 1: Lignin, Humic Substances and Coal. Hofrichter M & Steinbuchel A (eds). Wiley-VCH. Weinheim, DE. pp. 129-180.

Hess J, Leitner C, Galhaup C, Kulbe KD, Hinterstoisser B, Steinwender M & Haltrich D (2002) Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Appl. Biochem. Biotech.* 98-100:229-241.

Janusz G, Kucharzyk KH, Pawlik A, Staszczak M & Paszczynski AJ (2013) Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. *Enz. Microb. Technol.* 52:1-12.

Jaszek M, Grzywnowicz K, Malarczyk E & Leonowicz A (2006) Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions. *Pest. Biochem. Physiol.* 85:147-154.

Karaffa L, Váczy K, Sándor E, Biró S, Szentirmmai A & Pócsi I (2001) Cyanide-resistant alternative respiration is strictly correlated to intracellular peroxide levels in *Acremonium chrysogenum. Free Radic. Res.* 34:405-416.

Kreiner M, Mc Neil B & Harvey LM (2000) "Oxidative stress" response in submerged cultures of a recombinant *Aspergillus niger* B1-D. *Biotechnol. Bioeng.* 70(6):662-669.

Kreiner M, Harvey ML & McNeil B (2003) Morphological and enzymatic responses of a recombinant *Aspergillus niger* to oxidative stressors in chemostat cultures. *J. Biotechnol.* 100(3):251-260.

Krull R, Cordes C, Horn H, Kampen I, Kwade A, Neu TR & Nörtemann B (2010) Morphology of filamentous fungi: linking cellular biology to process engineering using *Aspergillus niger*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol* 121:1-21.

Krull R, Wucherpfennig T, Eslahpazir ME, Walisko R, Melzer G, Hempel DC, Kampen I, Kwade A & Wittmann C (2013) Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *J. Biotechnol.* 163:112-123.

Lang M, Kanost MR & Gorman MJ (2012) Multicopper Oxidase-3 is a laccase associated with the peritrophic matrix of *Anopheles gambiae*. *PLOS ONE* 7(3):e33985.

Lettera V, Pezzella C, Cicatiello P, Piscitelli A, Giacobelli VG & Galano E (2016) Efficient immobilization of a fungal laccase and its exploitation in fruit juice clarification. *Food Chem.* 196:1272-1278.

Li Q, Harvey LM & McNeil B (2008) Oxygen enrichment effects on protein oxidation, proteolytic activity and the energy status of submerged batch cultures of *Aspergillus niger* B1-D. *Process Biochem.* 43:238-243.

Li Q, Harvey LM & McNeil B (2009) Oxidative stress in industrial fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.* 29:199-213.

Li Q, Bai Z, O'Donnell A, Harvey LM, Hoskisson PA & McNeil B (2011) Oxidative stress in fungal fermentation processes: the roles of alternative respiration. *Biotechnol. Lett.* 33:457-467.

Magnani T, Soriani, FM, Martins VP, Nascimento AM, Tudella VG, Curti C & Uyemura SA (2007) Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 271:230-238.

Márquez-Rocha FJ, Guillén GK, Sánchez JE & Vázquez-Duhalt R (1999) Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. *Biotechnol. Techniques* 13:29-32.

Mate DM & Alcalde M (2016) Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microb. Biotechnol.* 1751-7915.

Metz B, Kossen NWF & van Suijdam JC (1979) The rheology of mould suspensions. *Adv. Biochem. Eng.* 11:104-156.

Moore AL, Albury MS, Crichton PG & Affourtit C (2002) Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends Plant. Sci.* 7:478-481.

Morozova OV, Shumakovich GP, Shleev SV & Yaropolov YI (2007) Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43(5):523-535.

Onken U & Liefke E (1989) Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 40:137-169.

Pandey A, Selvakumar P, Soccol SR & Nigam P (1999) Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.* 77(1):149-162.

Pandey A, Soccol CR & Mitchell D (2000) New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem.* 35(10):1153-1169.

Papagianni M (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* 22:189-259.

Penninckx, M (2000) A short review on the role of glutathione in the response of yeast to nutritional, environmental and oxidative stresses. *Enzyme Microb. Technol.* 26:737-742.

Pointing, SB & Vrijmoed LLP (2000) Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16(3):317-318.

Riley GL, Tucker KG, Paul GC & Thomas CR (2000) Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology. *Biotechnol. Bioeng.* 68(2):160-172.

Robene-Soustrade I & Lung-Escarmant B (1997) Laccase isoenzyme patterns of european *Armillaria* species from culture filtrates and infected woody plant tissues. *Europ. J. Forest Pathology* 27(2):105-114.

Rocha-Valadez JA, Hassan M, Corkidi G, Flores C, Galindo E & Serrano-Carreón L (2005) 6-pentyl-alfa-pyrone production by *Trichoderma harzianum*: the influence of energy dissipation rate and its implications on fungal physiology. *Biotechnol. Bioeng.* 91:54-61.

Rocha-Valadez JA, Albiter, V, Caro MA, Serrano-Carreón L & Galindo E (2007) A fermentation system designed to independently evaluate mixing and/or oxygen tension effects in microbial processes: development, application and

performance. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 30:115-122.

Rodríguez S, Gundín M, Lorenzo M & Sanromán MA (2002) Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochem.* 38:249-255.

Serrano-Carreón L, Galindo E, Rocha-Valadez JA, Holguín-Salas A & Corkidi G (2015) Hydrodynamics, fungal physiology, and morphology. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 149:55-90.

Shraddha, Shekher R, Sehgal S, Kamthania M & Kumar A (2011) Laccase: Microbial sources, production, purification and potential biotechnological applications. *Enzyme. Res.* 2011:217861

Sigler K, Chaloupka J, Brozmanova J, Stadler N & Hofer M (1999) Oxidative stress in microorganisms. I. Microbial vs. higher cells damage and defenses in relation to cell aging and death. *Folia Microbiol. (Praha)* 44(6):587-624.

Silvério SC, Moreira S, Milagres AMF, Macedo EA, Teixeira JÁ & Mussatto SI (2013) Laccase production by free and immobilized mycelia of *Peniophora cinérea* and *Trametes versicolor*: a comparative study. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36:365-373.

Tavares APM, Coelho MAZ, Agapito MSM, Coutinho JAP & Xavier AMRB (2006) Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 134:233-248.

Thurston CF (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology-Sgm* 140:19-26.

Tinoco-Valencia R, Gómez-Cruz C, Galindo E & Serrano-Carreón L (2014) Toward an understanding of the effects of agitation and aeration on growth and laccases production by *Pleurotus ostreatus. J. Biotechnol.* 177:67-73.

Toushik SH, Lee KT, Lee JS & Kim KS (2017) Functional applications of lignocellulolytic enzymes in the fruit and vegetable processing industries. *J. Food Sci.* 82(3): 585-593.

Virk AP, Sharma P & Capalash N (2012) Use of laccase in pulp and paper industry. *Biotechnol. Prog.* 28(1):21-32.

Voulgaris I, O'Donnell A, Harvey LM & McNeil B (2012) Inactivating alternative NADH dehydrogenases: enhancing fungal bioprocesses by improving growth and biomass yield? *Sci. Rep.* 2,322.

Wesenberg D, Kyriakides I & Agathos SN (2003) White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* 22(1-2):161-187.

Wittler R, Baumgartl H, Lübbers DW & Schügerl K (1986) Investigations of oxygen transfer into *Penicilium chrysogenum* pellets by microprobe measurements. *Biotechnol. Bioeng.* 28:1024-1036.

Wösten HA, Moukha SM, Sietsma JH & Wessels JG (1991) Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.* 137:2017-2023.

Yang J, Li W, Ng TB, Deng X, Lin J & Ye X (2017) Laccases: Production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. *Front. Microbiol.* 16(8):832.

Ye B, Faltin Z, Ben-Hayyim G, Eshdat Y & Gressel J (2000) Correlation of glutathione peroxidase to paraquat/oxidative stress resistance in *Conyza* determined by direct fluorometric assay. *Prestic. Biochem. Physiol.* 66:182-194.

Yin L, Ye J, Kuang S, Guan Y & You R (2017) Induction, purification and characterization of a thermos and pH stable laccase from *Abortiporus biennis* J2 and its application on the clarification of litchi juice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81(5):1033-1040.

Yukioka H, Inagaki S, Tanaka R, Katoh K, Miki N, Mizutani A & Masuko M (1998) Transcriptional activaction of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1442:161-169.

Zhao Y, Li J, Chen Y & Hang H (2009) Response to oxidative stress of *Coriolus versicolor* induced by exogenous hydrogen peroxide and paraquat. *Annals of Microbiol.* 59(2):221-227.

Zmack PM, Podgornik A, Podgornik H & Koloini T (2006) Impact of pellet size on growth and lignin peroxidase activity of *Phanerochaete chrysosporium. World J. Microbiol. Biotechnol.* 22:1243-1249.

TRABAJO GANADOR DEL PREMIO ALFREDO SÁNCHEZ MARROQUÍN, CATEGORÍA DOCTORADO

Lo que nos revela la metagenómica sobre la taxonomía y el potencial metabólico del consorcio bacteriano responsable de la maduración del queso Cotija

Alejandra Escobar-Zepeda[1], Maricarmen Quirasco[2]*

[1] Instituto de Biotecnología, UNAM. Avenida Universidad 2001, Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Mor., México; [2] Facultad de Química, UNAM. Conj. E, L-312, Circuito de la Investigación Científica s/n, Cd. Universitaria, 04510, Cd. Mx., México.

Autor para correspondencia: quirabma@unam.mx

Resumen

El queso Cotija es un alimento lácteo madurado, que se ha elaborado y consumido desde hace más de 400 años en la sierra entre Jalisco y Michoacán, México. Su sabor y calidad han trascendido dentro y fuera del país. La materia prima empleada es leche no pasteurizada, sal de grano y cuajo, y el proceso completo de elaboración se lleva a cabo a temperatura ambiente. El metabolismo fermentativo de la microbiota bacteriana que participa en la maduración del queso –proceso de al menos tres meses– es responsable de generar un producto inocuo y con características sensoriales únicas. Dicho consorcio fue estudiado mediante el análisis bioinformático de su metagenoma, lo que permitió su caracterización taxonómica con gran sensibilidad, así como la predicción de su potencial metabólico. Encontramos tres géneros bacterianos dominantes (*Lactobacillus*, *Weissella* y *Leuconostoc*), de los cuales dos de ellos no son microorganismos comunes en quesos madurados. El resto de la diversidad bacteriana está conformada por más de 500 géneros distintos, entre los que no se encontraron bacterias patógenas. Además, la predicción de función de sus genes nos permitió detectar rutas metabólicas asociadas a la generación del perfil sensorial del queso, debido principalmente al catabolismo de ácidos grasos y degradación de aminoácidos de cadena ramificada. Por último, se analizó la presencia de genes codificantes para bacteriocinas e, inesperadamente, se detectó una mayor cantidad de genes de inmunidad en comparación con los genes codificantes de bacteriocinas, lo que sugiere un mecanismo particular de control de las poblaciones microbianas en el consorcio.

Palabras clave: Análisis bioinformático, consorcio bacteriano, inocuidad alimentaria, potencial metabólico, bacteriocinas, queso madurado.

Abstract

Cotija cheese is a ripened dairy product that has been manufactured and consumed for more than 400 years in the mountains between Jalisco and Michoacán, Mexico. Its taste and quality have transcended both inside and outside the country. The raw material for its production is unpasteurized milk, raw sea salt and rennet, and its complete manufacture is carried out at room temperature. The fermentative metabolism of bacterial microbiota involved in cheese ripening – process of at least three months– is responsible for generating a safe product with unique sensory characteristics. This consortium was studied through the bioinformatic analysis of its metagenome, which allowed its taxonomical characterization with high sensitivity, as well as the prediction of its metabolic potential. We found three dominant genera (*Lactobacillus*, *Weissella* and *Leuconostoc*), from which two are not commonly found in ripened cheeses. The rest of the bacterial diversity was made up of more than 500 different bacterial genera, among which, no pathogenic bacteria were found. In addition, the prediction of function of their genes allowed us to detect metabolic pathways associated with the generation of the cheese sensory profile, mainly due to fatty acid catabolism and branched chain amino acid degradation. Finally, we analyzed the presence of coding genes for bacteriocins and, unexpectedly, we detected a higher amount of immunity genes compared to bacteriocin-coding genes, suggesting a particular mechanism of microbial population control in the consortium.

Keywords: Bioinformatic analysis, bacterial consortium, food safety, metabolic potential, bacteriocins, ripened cheese.

Introducción

El queso Cotija es un alimento mexicano que se produce de forma artesanal desde el siglo XVI. Es originario de la sierra que se encuentra entre Jalisco y Michoacán (sierra de JalMich), de gran importancia en esta región y que ha ganado fama debido a que es reconocido internacionalmente por su sabor y calidad (por ejemplo, obtuvo el premio al mejor queso extranjero en el Campeonato Mundial de Cremona, Italia, 2006). Cada una de las piezas de queso tiene forma cilíndrica y pesa entre 20 y 30 kg, es madurado, de pasta friable y sabor intenso.

La popularidad de este queso, ha propiciado la aparición de otros que llevan el mismo nombre y que se producen en otras partes del país, pero cuyo proceso de elaboración y características sensoriales no son las propias del queso Cotija de JalMich. Dicho fenómeno llevó a los queseros a organizarse para documentar las Reglas de Uso para la producción del Queso Cotija Región de Origen para así obtener, en el 2005, la Marca Colectiva que los acredita como los únicos productores del auténtico queso Cotija Región de Origen (RO) (Álvarez et al., 2005).

En las Reglas de Uso para la producción del Queso Cotija RO, se detalla su proceso de elaboración, que consiste

básicamente en utilizar como materia prima principal, leche cruda obtenida de ganado criollo o cebú alimentado por libre pastoreo. La leche se filtra con lienzos limpios y se le añade cuajo de origen animal. La cuajada es cortada, desuerada y amasada a mano mientras se le añade sal de mar de grano de Colima. A continuación, la masa salada se moldea en mantas de ixtle o algodón para darle la forma cilíndrica. Posteriormente, el queso se mantiene "fajado" durante 15 días, y al término de este periodo se "desfaja" para continuar con la maduración. Durante el fajado y maduración, los quesos se mantienen en cuartos destinados específicamente para esta actividad a la temperatura y humedad del ambiente, donde constantemente se limpian y voltean. El producto madurado más joven se consume después de 90 días, pero mientras más se prolongue dicho proceso, el queso adquiere un perfil de sabor y olor más complejo e intenso, por lo que adquiere plusvalía.

Dadas las condiciones de elaboración del queso Cotija RO, ha sido de gran importancia establecer la calidad microbiológica del alimento con el fin de defender un proceso artesanal y el uso de materias primas mínimamente procesadas. Por esta razón, fue de gran importancia en 2011, la publicación de la Norma Mexicana para el Queso Cotija RO Artesanal Madurado (NMX-F-735-COFOCALEC, 2011), donde se especifica, entre otras cosas, las características de calidad microbiana que se esperan en dicho producto.

El escrutinio de las poblaciones microbianas en el queso Cotija RO mediante estrategias de microbiología clásica y moleculares (tanto dependientes de PCR como de hibridación con sondas de ADN), han permitido establecer una relación clara entre la diversidad microbiana dentro de la matriz alimentaria, con sus características fisicoquímicas desde estadios tempranos de su elaboración y hasta su maduración. En dicho proceso se modifican los valores de actividad acuosa, potencial redox y pH, lo que permite la selección natural de ciertas especies bacterianas que son capaces de resistir condiciones de baja disponibilidad de agua, pobres de oxígeno y ácidas (Escobar, 2012), favoreciendo el desarrollo principalmente de bacterias ácido lácticas (LAB por sus siglas en inglés) y la exclusión de bacterias patógenas y coliformes, estas últimas presentes en las primeras etapas de elaboración (Bravo, 2008; Zúñiga, 2009). Dichos estudios fueron de vital importancia para entender, a grandes rasgos, la dinámica poblacional microbiana de un alimento inoculado en sus ingredientes con una alta diversidad, y enriquecida en cada paso de manipulación durante su elaboración.

La necesidad de profundizar en el estudio de los microorganismos presentes al tiempo mínimo de maduración del queso Cotija RO, surge con el fin de esclarecer cuáles son los microorganismos vencedores en este ambiente hostil (estrés fisicoquímico y bioquímico), y a los que se les puede atribuir la obtención de un alimento de tan alta calidad

sensorial e inocuidad microbiológica. El desarrollo de nuevas técnicas de análisis de ADN aplicadas al estudio de poblaciones microbianas, permite obtener información nueva sobre la diversidad de especies, así como de su potencial metabólico sin el sesgo que implica cultivar, clonar o amplificar fragmentos de ADN.

Los alimentos fermentados en general y los quesos elaborados artesanalmente en particular, son un reservorio de microorganismos que poseen actividades metabólicas interesantes desde el punto de vista alimentario y biotecnológico. El análisis bioinformático del metagenoma del queso Cotija RO permitió la caracterización del consorcio bacteriano presente en una muestra representativa con tres meses de maduración; así como la detección de funciones metabólicas relacionadas con la producción de compuestos de olor y sabor y otras relacionadas con su inocuidad. En la actualidad existen pocos reportes de análisis metagenómicos en alimentos de fermentación natural y muy pocos sobre quesos madurados (Dugat-Bony et al., 2015; Wolfe et al., 2014), por lo que los resultados obtenidos son una aportación relevante en el campo de la biotecnología y microbiología de alimentos. Además, son de utilidad para comprobar que el consumo de este alimento es microbiológicamente seguro aun cuando haya sido elaborado con leche no pasteurizada.

Materiales y métodos

Muestreo de queso Cotija RO y secuenciación de alto rendimiento del metagenoma

Se utilizaron 25 quesos Cotija RO (Región de Origen), elaborados por diferentes productores que cumplían con la NMX-F-735-COFOCALEC, 2011. Los quesos se redujeron a un tamaño de partícula de 2 mm, se pesaron 100 g de cada uno y se hizo una mezcla homogénea. Para la extracción de paquete celular bacteriano (por quintuplicado) se pesaron 15 g de la mezcla de quesos y se procedió de acuerdo a Zúñiga (2009) Cada paquete celular fue tratado con 1 U de DNasa I (Thermo Scientific) para eliminar el ADN contaminante (Willner et al., 2009), en este caso de vaca. Una vez inactivada la DNasa I por calor, la suspensión celular fue tratada con lisozima (Sigma-Aldrich) y mutanolisina (Sigma-Aldrich). Además, se adicionó RNasa A de páncreas bovino (Thermo Scientific) y proteinasa K (Sigma-Aldrich). Finalmente, se utilizó SDS al 10% p/v y 200 µL de NaCl 6M para precipitar el material genético.

El ADN fue extraído y purificado por el método fenol-cloroformo-isoamílico con un paso de purificación con el kit QIAquick de Qiagen (Qiagen Inc.). Se construyó una sola biblioteca en la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática (IBt, UNAM), con el kit TruSeq v2 (Illumina Inc.) a partir del pool de 5 extracciones independientes de ADN. La secuenciación se realizó en el LANGEBIO, en el equipo HiSeq2000 con configuración pareada de 100 ciclos por lado. Las secuencias se encuentran disponibles en el

portal SRA de NCBI con el identificador de bioproyecto SAMN03771674.

Análisis bioinformático de secuencias

Las secuencias de bovino se filtraron mapeando las lecturas contra el genoma de *Bos taurus* con BWA v0.7.9 (Li y Durbin, 2009). La asignación de identidad taxonómica se llevó a cabo siguiendo dos estrategias independientes. El software MOCAT v1.3 (Kultima et al., 2012) utiliza un set de genes marcadores de copia única y realiza mapeos sobre la base de datos de RefMG asignando la taxonomía a aquellos con identidad >97%. Y Parallel-Meta v2.4.1 (Su et al., 2014), que predice las secuencias ribosomales extrapolando modelos ocultos de Markov y les asigna identidad taxonómica con el mejor hit de Megablast contra la base de datos de RDP que está incluida en la distribución del programa. El cálculo de los estimadores de diversidad se realizó con el paquete Phyloseq v1.12.2 (McMurdie y Holmes, 2013), disponible por Bioconductor, de R.

Para la anotación funcional de las secuencias, las lecturas filtradas fueron ensambladas usando IDBA-UD v1.1.1 (Peng et al., 2012). Las lecturas se mapearon con BWA v0.7.9 sobre los fragmentos ensamblados para obtener una estadística sobre el número de lecturas utilizadas en el ensamble. Sobre los fragmentos reconstruidos, se predijeron marcos de lectura abiertos usando el programa MetaGeneMark v2.1.0 (Zhu et al., 2010). Las secuencias en aminoácidos se anotaron por homología contra la base de datos de UniProtKB/Swiss-Prot con umbral esperado de 1e-05 primero con UBLAST (Edgar, 2010) y aquellas sin resultado se anotaron con blastp de BLAST v2.2.28+ (Camacho et al., 2009). Adicionalmente, se buscaron dominios funcionales conservados mediante el algoritmo hmmerscan del paquete HMMER v3.1b1 (Eddy, 2011) contra la base de datos Pfam-A. Los resultados se integraron adaptando el software Trinotate v2.0.1 (Grabherr et al., 2011) y la reconstrucción de rutas metabólicas se realizó con GhostKOALA v2.0 (Kanehisa et al., 2016).

A partir del resultado de la anotación, se realizó la búsqueda de funciones de interés relacionadas con la producción de compuestos de olor y sabor; y para la identificación de bacteriocinas, se extrajeron los identificadores de Pfam correspondientes a las proteínas estructurales, así como de otras relacionadas con su síntesis, procesamiento y sistema de inmunidad, y dicho escrutinio se complementó con los resultados generados por BAGEL3 (van Heel et al., 2013).

Finalmente, se hizo la reconstrucción de los genomas de las especies más abundantes usando las siguientes referencias: *L. plantarum* WCFS1, *L. mesenteroides* ATCC 8293 y *W. paramesenteroides* ATCC 33313 de la base de datos del NCBI. Para orientar los *contigs* sobre dichas referencias se utilizó el programa ABACAS v1.3.1 (Assefa et al., 2009) y para el mapeo de las lecturas se usó BWA v0.7.9.

Resultados y discusión

Análisis taxonómico

La anotación de las secuencias metagenomicas de queso Cotija RO (Región de Origen) con genes marcadores de copia única permitió identificar una riqueza de 45 géneros bacterianos en los que se encuentran contenidas 86 especies diferentes, la mayoría de ellas del phylum de los *Firmicutes* (99.8%) y algunas de los *fila Actinobacteria* (~0.1%) y *Proteobacteria* (~0.01%). Para fines prácticos de este análisis, los géneros bacterianos se clasificaron en tres grupos claramente definidos de acuerdo a su abundancia. Se consideró como dominantes a todos aquellos que presentaran más del 10% de abundancia; subdominantes si estaban entre el 1 y el 10% y como pobremente representados a los que tuvieran menos del 1% de abundancia relativa total. La población dominante estuvo compuesta por tres géneros que representan más del 80% de la riqueza total de especies, mientras que en la fracción subdominante se observaron cuatro géneros más (Tabla 1). Los otros 38 géneros detectados forman parte de la población no dominante.

En contraste a lo obtenido en el análisis por genes marcadores de copia única, en la anotación con el gen ribosomal 16S se detectó una riqueza de 574 géneros bacterianos, un orden de magnitud más que con el enfoque anterior, de los cuáles el 98% fueron *Firmicutes* y el resto fueron identificados en los *Fila Actinobacteria* y *Proteobacteria* de todas las clases, y otros minoritarios dentro de los *Fila Acidobacteria* y *Bacteroidetes,* así como algunos géneros dentro del dominio de las *Archaeas* (Figura 1). La fracción dominante estuvo integrada por los mismos tres géneros bacterianos identificados por marcadores de copia única, y en el caso de la población subdominante siete géneros más se integraron a la lista (Tabla 1). De los siete géneros bacterianos que no aparecen como subdominantes por copia única, *Pediococcus* (*acidilactici* y *pentosaseus*) y *Bacillus* (*cereus* y *subtilis*) fueron identificados como parte de la población que representa menos del 1%; mientras que *Bavariicoccus, Marinilactibacillus, Fructobacillus, Alkalibacterium* y *Carnobacterium* no fueron identificados mediante marcadores unicopia. Los más de 500 géneros bacterianos restantes tuvieron una abundancia relativa menor al 1%. Lo anterior indica que la anotación taxonómica basada en el gen ribosomal 16S permite observar una mayor riqueza de géneros bacterianos debido a la disponibilidad de bases de datos más grandes. Las bases de datos incluidas en cada *pipeline* son de diferente tamaño, RDP tiene 8,127 entradas para eubacterias y 295 para *Archaeas*, mientras que RefMG tiene 3,319 y 130, respectivamente.

Por otro lado, la anotación con genes codificantes de copia única permite obtener resolución a nivel de especie. Esto ocurre debido a que la variabilidad en el gen ribosomal 16S está limitada por su funcionalidad en la maquinaria traduccional, lo que resulta en un alto grado de conservación

en la secuencia entre especies, esto indica que una alta similitud de secuencias de genes ribosomales no implica necesariamente identidad a nivel de especie (Fox et al., 1992; Klappenbach et al., 2000); adicionalmente, se ha reportado que la heterogeneidad intragenómica de este gen multicopia puede llegar a ser de hasta 6.5% (Cilia et al., 1996; Wang et al., 1997). Por estas razones, en trabajos de reconstrucción de la estructura de comunidades microbianas y estimación de la diversidad, se recomienda complementar los resultados con el análisis de genes marcadores de copia única que podrían llegar a ser incluso más confiables que los obtenidos por ADNr 16S (Bonilla-Rosso et al., 2012). Ambos resultados de anotación taxonómica son congruentes y complementarios entre sí sobre todo en poblaciones dominantes. Dichos resultados se encuentran representados en una gráfica interactiva disponible como material suplementario de la publicación de Escobar-Zepeda et al. (2016).

Población dominante en el queso Cotija RO

A los tres meses de maduración, los géneros y especies más exitosos hablando en términos de abundancia en el queso Cotija RO, son bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSLAB por sus siglas en inglés), que tienen metabolismo heterofermentativo y son productores importantes de compuestos que confieren olor y sabor al alimento. Dicha comunidad bacteriana está representada principalmente por tres géneros cuya abundancia total relativa representa más del 60%. Estos son *Lactobacillus plantarum*, *Weissella paramesenteroides* y *Leuconostoc mesenteroides* (Tabla 1).

La presencia de bacterias del género *Lactobacillus* es común en quesos tanto frescos como madurados (Bautista-Gallego et al., 2014; Ercolini et al., 2012) y su abundancia está directamente relacionada con el tiempo de maduración (Quigley et al., 2012). Otros géneros que también han sido descritos frecuentemente como parte de la microbiota bacteriana de quesos madurados naturalmente elaborados con leche no pasteurizada y que fueron encontrados en el queso Cotija RO como parte de la población subdominante son *Streptococcus, Lactococcus* y *Enterococcus*, (Duthoit et al., 2003; Fuka et al., 2013; Masoud et al., 2012; Quigley et al., 2012). En contraste, los géneros *Leuconostoc* y *Weissella* no se asocian comúnmente a quesos madurados y nunca han sido identificados como población dominante (Fuka et al., 2013; Masoud et al., 2012), por lo que este hecho puede considerarse como una firma distintiva del queso Cotija RO Región de Origen.

La presencia de *Weissella* y *Leuconostoc* ha sido reportada en leche cruda de vaca (Masoud et al., 2012) así como en la superficie de contenedores de madera y en el aire de lugares donde se elaboran otro tipo de quesos (Litopoulou-Tzanetaki y Tzanetakis, 2014). Durante la elaboración del queso Cotija RO se añade sal de grano marina y la cuajada salada es amasada durante un tiempo considerable sobre una mesa que suele ser

de madera, hasta que la sal se incorpora completamente. Dicho proceso es característico de la elaboración de este queso, lo que podría explicar en parte lo peculiar de la estructura poblacional de su microbiota.

El hecho de no haber identificado por métodos tradicionales a dos de los géneros más importantes en dominancia puede deberse por un lado a la dificultad de cultivar en general a las LAB y en particular a estos géneros. Es posible que los medios de cultivo empleados tengan deficiencias en algunos factores de crecimiento específicos para las cepas provenientes del queso Cotija RO o que, por el contrario, su composición con exceso de nutrientes favorezca el crecimiento de microorganismos no dominantes, aunado a que se ha reportado que en el caso de *Weissella,* ésta puede presentar crecimiento lento en los medios de cultivo convencionales (Björkroth y Holzapfel, 2006). En un trabajo reciente, se reportó la presencia de *Weissella* y *Leuconostoc* mediante PCR-DGGE de las regiones variables V7-V8 del gen ribosomal 16S a partir de ADN extraído de muestras de queso Cotija RO Región de Origen (Chombo-Morales et al., 2016).

Población subdominante y fracción de no dominantes

Todos los géneros bacterianos identificados por métodos dependientes e independientes de cultivo fueron identificados en el metagenoma mediante el análisis del gen ribosomal 16S. Además, se confirmaron los resultados reportados por FISH para los géneros *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp., cuya abundancia fue en conjunto del 11% del total de la carga bacteriana total en el queso Cotija RO (Escobar, 2012), pues dichos resultados tienen concordancia con lo observado en el metagenoma, dado que los tres géneros mencionados pertenecen a la población de subdominantes y de acuerdo a las abundancias calculadas mediante la anotación taxonómica, la suma de estos tres géneros fue de 8.3%.

Tabla 1. Anotación taxonómica de la fracción que representa más del 1% de la riqueza total relativa. (Escobar-Zepeda et. al., 2016).

Abundancia	Marcadores de copia única		Gen 16S ADNr
	Género[a]	Especie[b]	Género[a]
Dominante	*Lactobacillus* (33.4)	*plantarum* (95.9)	*Lactobacillus* spp. (20.7)
		farciminis (2.0)	
		brevis (0.7)	
		rhamnosus (0.7)	
		casei (0.5)	

		paracasei (0.05)	
		coryniformis (0.01)	
		buchneri (<0.01)	
	Weissella (26.7)	*paramesenteroides* (99.98)	*Weissella* spp. (29.6)
		cibaria (0.02)	
	Leuconostoc (21.9)	*mesenteroides* (99.9)	*Leuconostoc* spp. (11.3)
		citreum (0.03)	
		kimchii (<0.01)	
		sp. C2 (<0.01)	
Subdominante	*Aerococcus* (8.3)	*viridans* (100)	*Aerococcus* spp. (8.9)
	Enterococcus (6.3)	*faecium* (51.0)	*Enterococcus* spp. (3.4)
		italicus (29.7)	
		faecalis (16.8)	
		casseliflavus (1.5)	
		gallinarum (0.7)	
		sp. 7L76 (0.3)	
	Lactococcus (2.0)	*garvieae* (71.2)	*Lactococcus* spp. (2.5)
		lactis (28.8)	
	Staphylococcus (1.1)	*aureus* (84.9)	*Staphylococcus* spp. (3.0)
		saprophyticus (13.7)	
		carnosus (0.7)	
		epidermidis (0.5)	
		haemolyticus (0.1)	
		hominis (0.05)	
		lugdunensis (0.01)	
			Bavariicoccus spp. (2.2)
			Marinilactibacillus spp. (2.2)
			Pediococcus spp. (2.0)
			Bacillus spp. (1.9)
			Fructobacillus spp. (1.4)
			Alkalibacterium spp. (1.4)
			Carnobacterium spp. (1.0)

[a] En paréntesis, la abundancia relativa de cada género con respecto a la abundancia total. [b] En paréntesis, la abundancia relativa con respecto al 100% de su género respectivo.

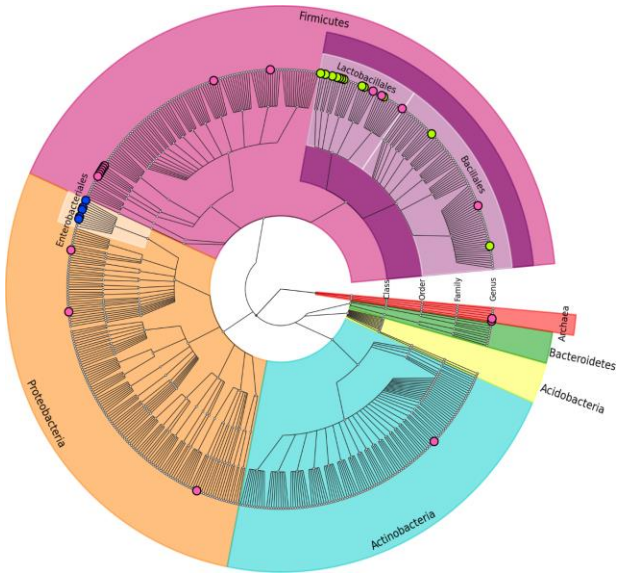

Figura 1. Cladograma de la anotación taxonómica de los principales fila detectados por el análisis del gen ribosomal 16S. Algunos clados se resaltan en los nodos terminales: en rosa las bacterias halófilas (*Tetragenococcus, Marinilactibacillus, Halolactibacillus, Alkalibacterium, Dehalobacter, Thermohalobacter, Halanaerobiales, Haloglycomyces, Thiohalomonas, Desulfohalobium, Halomonas, Halobacterium, Haloquadratum*); en azul las coliformes (*Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Hafnia, Escherichia*) y en verde aquellos géneros que representan más del 1% de abundancia total relativa (*Bacillus, Staphylococcus, Aerococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc, Weissella, Lactococcus, Alkalibacterium, Carnobacterium, Marinilactibacillus, Bavariicoccus, Fructobacillus*). Figura generada con GraPhlAn v0.9.7 (Asnicar et al., 2015) Figura tomada de Escobar-Zepeda et al. (2016).

La fotografía de la estructura poblacional de la microbiota del queso Cotija RO a los tres meses de maduración, indica la presencia de una gran variedad de LAB tanto homo como heterofermentadoras, lo que incrementa la diversidad de genes y rutas metabólicas posibles y por ende, la variedad de metabolitos que tienen repercusión en la inocuidad, atributos sensoriales y compuestos de importancia biotecnológica. Al comienzo de cualquier fermentación láctica, las especies más abundantes o exitosas son las bacterias ácido lácticas iniciadoras (SLAB por sus siglas en inglés), que son productoras importantes de lactato con metabolismo homofermentativo tales como *Lactococcus lactis* y algunas especies de lactobacilos como *L. farciminis*. Conforme la maduración progresa, la población de SLAB disminuye y la de NSLAB se incrementa, dando paso al crecimiento de bacterias con metabolismo heterofermentativo obligado y facultativo tales como *Leuconostoc, Weissella* y otras especies de lactobacilos como *L. plantarum*, lo que permite una producción importante de compuestos de olor y sabor (Beresford y

Williams, 2004; Björkroth y Holzapfel, 2006; McSweeney, 2004).

Además de los géneros reconocidos como SLAB y NSLAB, dentro de la fracción subdominante se encuentran bacterias de los géneros *Marinilactibacillus* y *Alkalibacterium*, reconocidos como bacterias halófilas alcalófilas lácticas (HALAB por sus siglas en inglés) y que han sido descritas como de origen marino (Ishikawa et al., 2007, 2013). El otro género que forma parte del grupo de las HALAB es *Halolactibacillus*, también presente en el queso Cotija RO formando parte de la población pobremente representada. *Tetragenococcus halophilus,* es otro ejemplo de halófilo que forma parte del consorcio bacteriano de queso Cotija RO y que ha sido identificado en queso tipo Cotija RO (Morales et al., 2011).

La lista de halófilos se extiende a bacterias de diferentes fila (representados como círculos rosas en la Figura 1), la mayoría del dominio de las eubacterias como *Firmicutes* (*Halolactibacillus, Halobacillus, Dehalobacter, Thermohalobacter* y *Halanaerobiales*); *Actinobacteria* (*Haloglycomyces*), *Proteobacteria* (*Thiohalomonas, Desulfohalobium* y *Halomonas*), *Tenericutes* (*Haloplasma*); así como a algunas del domino *Archaea* (*Halobacterium* y *Haloquadratum*). Todas ellas representan menos del 1% de abundancia y muy probablemente fueron inoculadas durante el salado de la masa.

Dentro del grupo de los pobremente representados se encuentran algunos géneros catalogados como coliformes (representados como círculos azules en la Figura 1), aunque sus abundancias son muy bajas en el queso Cotija RO: *Enterobacter 0.0007%, Klebsiella 0.0004%, Citrobacter 0.0002% y E. coli 0.0007%* con respecto a la abundancia total. Considerando que la carga bacteriana en el queso Cotija RO es de $1X10^5$ células/g (Escobar, 2012), la proporción de enterobacterias correspondería a 1-2 células/g lo que no representa un riesgo para el consumidor (NMX-F-735-COFOCALEC, 2011; NOM-243-SSA1, 2010). En el mismo sentido de calidad microbiológica e inocuidad, los patógenos que no aparecen en el queso por ninguno de los dos métodos de anotación taxonómica son *L. monocytogenes, P. aeuruginosa, Salmonella spp., Yersinia spp.* ni *Brucella spp.*

Con el fin de descartar que la *E. coli* encontrada en el queso perteneciera a alguna de las cepas identificadas como patógenas para humano, se llevó a cabo una búsqueda de genes asociados a virulencia. Como referencia se tomó la lista de genes de virulencia para *E. coli* publicada en la base de datos del MOH *Key Laboratory of Systems Biology of Pathogens.* De la lista de genes asociados a las diferentes cepas patógenas, sólo se detectó el gen *aggR*, que codifica para un activador transcripcional en plásmido de *E. coli* enteroagregativa. Esto no implica necesariamente que dicha *E. coli* pueda tener un fenotipo patogénico a menos que se

identifiquen en la misma cepa otros genes de virulencia (Estrada-Garcia et al., 2014), por lo que la presencia de *E. coli* en el queso no representa un riesgo para el consumidor.

Anotación funcional de genes asociada a la producción de compuestos de olor y sabor

Las lecturas crudas, sin filtrar por calidad, se ensamblaron (estadísticas en Tabla 2) y el ejercicio de mapeo de las mismas sobre los contigs demostró que el 96.75% de éstas fueron utilizadas en el ensamble. La predicción de secuencias codificantes sobre el ensamble permitió recuperar ORFs con una longitud promedio de 630 nucleótidos y una distribución de longitud menor a 2,000 nucleótidos como es de esperarse en genomas bacterianos.

En el queso Cotija RO hay una gran variedad de bacterias ácido lácticas, lo que incrementa el número de genes disponibles y las posibles combinaciones de producción de metabolitos. Esto repercute en la complejidad del perfil de olor y sabor del alimento. En el esquema metabólico del KEGG de la Figura 2 se resaltan las vías relacionadas con la producción de compuestos de olor y sabor. Todas las rutas metabólicas del metabolismo de aminoácidos están completamente representadas en el metagenoma del queso Cotija RO, así como las de catabolismo de ácidos grasos y compuestos aromáticos. El consorcio bacteriano del queso Cotija RO tiene potencial para producir todos los compuestos de la Tabla 3, en cambio fue imposible la reconstrucción completa para la producción de otros compuestos reportados en quesos tales como propanona, indol, ácido isobutírico, ácido hidroxibenzóico, p-cresol y limoneno.

La reconstrucción de vías metabólicas se complementó con una búsqueda de enzimas relacionadas específicamente con el catabolismo de ácidos grasos, aminoácidos libres y otros metabolitos (Tabla 4). De esta forma se encontró anotación para una gran cantidad de aminotransferasas de aminoácidos de cadena ramificada pero ninguna para aminotrasferasas de los aminoácidos aromaticos tirosina y triptófano, lo cual resulta conveniente dado que algunos de sus compuestos de degradación, como el escatol, tienen perfiles de olor desagradables (Yvon y Rijnen, 2001). Adicionalmente, se identificaron genes con anotación para una amplia variedad de liasas de aminoácidos así como hidrolasas de ésteres carboxílicos.

Tabla 2. Estadísticas del ensamble y anotación del metagenoma de queso Cotija RO. (Escobar-Zepeda et. al., 2016).

Ensamble	
Número total de bases ensambladas (Mb)	104.9
Número total de contigs	65,162
Tamaño promedio de los contigs (bp)	1,610
Tamaño del contig más largo (bp)	186,928
Tamaño del contig más corto (bp)	200
N50 / N90 (bp)	3,854 / 547
Anotación	
Total de secuencias codificantes predichas	143,736
ORFs con anotación de HMMER/Pfam	97,063
ORFs con anotación de BLAST/Swiss-Prot	75,989
ORFs con asignación de número K por GhostKoala	57,747
Secuencias del gen ribosomal 16S extraídas	1,165,460
Secuencias de genes marcadores taxonómicos de copia única extraídas	1,284,541

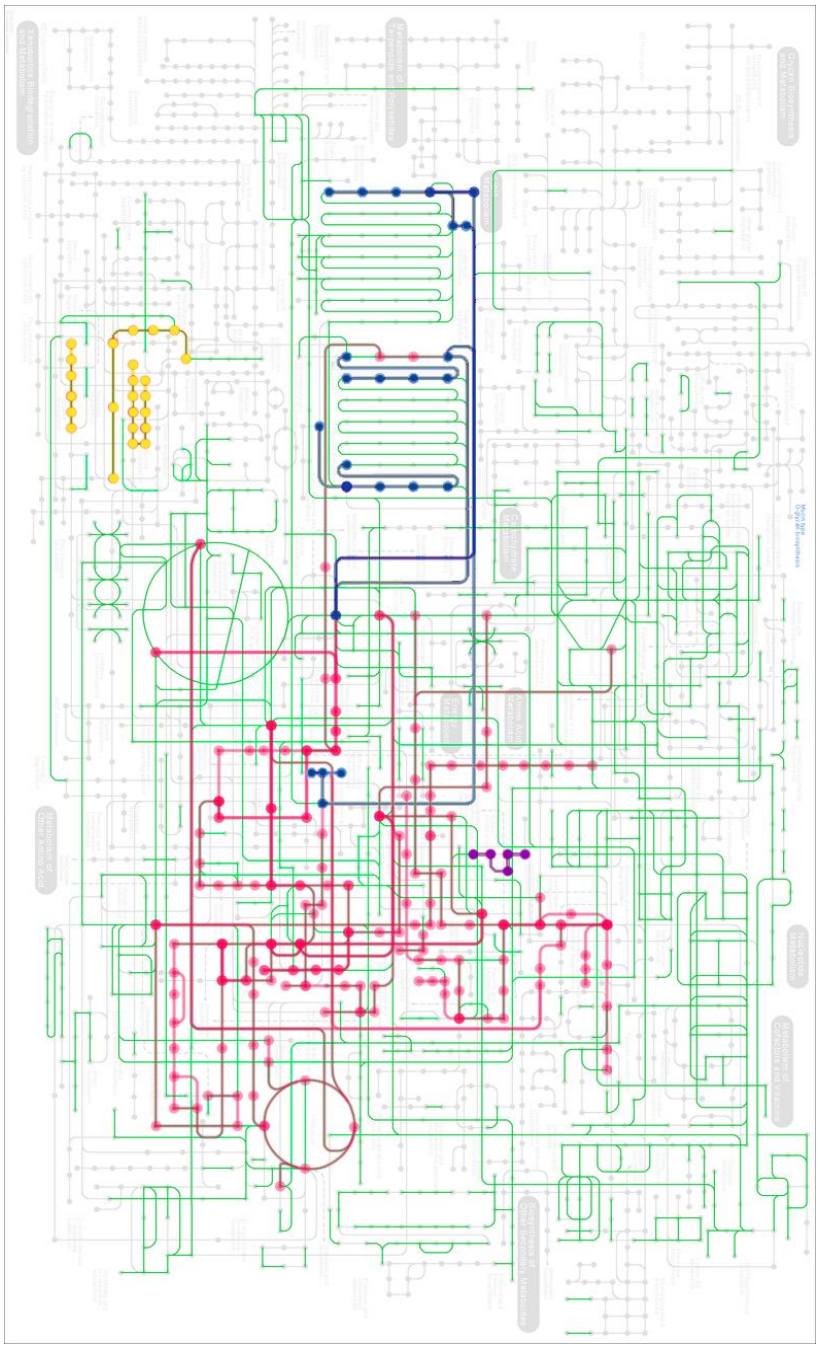

Figura 2. Mapa metabólico universal del KEGG. En verde, las rutas metabólicas identificadas en el metagenoma del queso Cotija RO. Se resaltan los módulos de interés en la producción de compuestos de olor y sabor: Amarillo, degradación de compuestos aromáticos; morado, metabolismo de azufre; azul, metabolismo de ácidos grasos; rosa, metabolismo de aminoácidos. (Escobar-Zepeda et. al., 2016).

Tabla 3. Resumen de las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de compuestos de olor y sabor en quesos. (Escobar-Zepeda et. al., 2016).

Ruta metabólica (KEGG id)	Compuesto [a]	Aroma / sabor [b]
Metabolismo de propanoato (00640)	Ácido propiónico	Pungente, rancio / agrio, ligeramente a queso
	Propionaldehído	Frutal, pungente / no reportado
	1-propanol	Mohoso, alcoholico / maduro, frutal
Metabolism de butanoato (00650)	2,3-butanodiona (diacetilo)	Mantequilla rancia / mantequilla
	Acetoína	Mantequilla, amaderado, yogurth / graso, cremoso, mantequilla
	Butirato	Rancio / grasa butírica
	Butanal	Pungente, olor aldéhico / no reportado
	1-butanol	Rancio, dulce, banana, fusel / banana, seco, fusel
Degradación de compuestos aromáticos (01220)	Benzaldehído	Almendras amargas / almendras amargas
	Ácido benzóico	Inoloro o característico muy débil / amargo
Glicolisis/gliconeogénesis (00010)	Etanol	Etéreo / ardiente
	Ácido láctico	Inoloro / acre
Metabolismo de piruvato (00620)	Ácido acético	Pungente, agrio, vinagre / ardiente
	Acetaldehído	Pungente, afrutado / no reportado
Metabolismo de nitrógeno (00910)	Amonio (NH_4^+)	Empalagoso, pungente, irritante, orina seca / no reportado
Degradación de ácidos grasos (00071)	Formación del respectivo aldehído y 1-alcohol	Frutal, floral, notas verdes / frutal (aldehídos)
		Dulce, fresco, floral / frutal, dulce (alcoholes derivados de 4-10 carbonos)
		Graso / grasoso, ceroso (alcoholes derivados de ácidos grasos de cadena larga)
Metabolismo de cisteína y metionina (00270)	Metanotiol	Pungente, col podrida, sulfuroso, ajo / desagradable a col
Metabolismo de fenilalanina (00360)	2-feniletanol	Como a rosas / amargo, dulce que recuerda a melocotón
	Fenilacetaldehído	Floral como a rosas[a] / no reportado
	Fenilacetato	No reportado / no reportado

[a] *Compuestos identificados más frecuentemente en quesos (Smit et al., 2005).* [b] *Información disponible para cada compuesto en el sitio de PubChem del NCBI.*

Las macromoléculas mayoritarias en el queso, que son fuente de sustratos para la obtención de compuestos de olor y sabor, son las proteínas y los lípidos. A partir de la proteólisis de las caseínas, que son las proteínas mayoritarias en el queso, se generan aminoácidos libres, que a su vez son el sustrato de las vías catabólicas que permiten la obtención de una amplia variedad de compuestos de olor y sabor. Se ha

reportado que *Lactobacillus plantarum* es responsable de un incremento en la proteólisis secundaria en quesos madurados, promoviendo la producción de aminoácidos libres (Milesi et al., 2008). Particularmente en el queso Cotija RO se han aislado cepas proteolíticas de los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Enterococcus* (Hernández, 2007). El consorcio bacteriano del queso Cotija RO tiene potencial metabólico para transformar aminoácidos libres en sus respectivos α-ceto ácidos por la vía de la transaminasa a partir de sustratos de cadena ramificada y fenilalanina. Dichos α-ceto ácidos son degradados a aldehídos por las α-ceto ácido descarboxilasas (Tabla 4). Es probable entonces que la fracción aldehídica en la mezcla de compuestos esté enriquecida en metabolitos producidos por el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada y fenilalanina así como de acetaldehído derivado del metabolismo de treonina (Tabla 4).

El otro sustrato importante en la producción de compuestos de olor y sabor en el queso son los ácidos grasos, mismos que en el queso Cotija RO se liberan por la actividad de bacterias lipolíticas de los géneros *Staphylococcus* y *Bacillus* (García, 2006, 2011). En el metagenoma del queso Cotija RO hay una gran cantidad de genes con anotación para carboxil esterasas que rompen enlaces éster para generar como productos un alcohol y un ácido carboxílico. La hidrólisis o la síntesis de ésteres son dependientes de la actividad de agua en el queso, así como de la presencia de otros ácidos grasos libres y alcoholes (Broadbent y Steele, 2005). Las rutas metabólicas del catabolismo de ácidos grasos fueron reconstruidas en su totalidad mediante la anotación de GhostKOALA (Figura 2). De acuerdo a lo observado en la anotación funcional del metagenoma del queso Cotija RO, los ácidos grasos libres son sustrato para reacciones de esterificación con alcoholes y tioles en la producción de ésteres y tioésteres. Los alcoholes pueden ser metabolitos de la degradación de carbohidratos y de los mismos ácidos grasos mientras que los tioles provienen del metabolismo de aminoácidos azufrados. Además, la degradación de ácidos grasos por β-oxidación con la generación concomitante de metil cetonas (Collins et al., 2003), lleva a la degradación de éstas últimas a su respectivo alcohol secundario por acción de la carbonil reductasa I (Tabla 4).

Además del catabolismo de aminoácidos y ácidos grasos, hay otros sustratos en el queso cuya degradación genera compuestos identificados como parte del perfil sensorial en quesos madurados. Tal es el caso de compuestos derivados del benceno como el tolueno y el xileno, pues se ha demostrado que su concentración en quesos está relacionada con la composición del cultivo iniciador (Centeno et al., 2002; Wang et al., 2012), y su degradación conduce a la formación de alcoholes como el 2,3-dimetilfenol y el 3,4-dimetilfenol. El primer compuesto se ha descrito con olor característico a humo y tinta y de sabor dulce,

mientras que el segundo tiene olor a establo con notas fecales (Czerny et al., 2011). Éste se ha identificado en la superficie de quesos madurados (Urbach, 1997) y particularmente en el queso Cotija RO podría explicar ciertas notas identificadas empíricamente en el perfil sensorial. Cabe mencionar que dado que el potencial metabólico del consorcio para degradar aminoácidos, ácidos grasos libres y otros productos intermedios, la gama de compuestos que participan en el perfil de olor y sabor del queso es mucho más amplia. Particularmente la gran cantidad de aldehído y alcohol deshidrogenasas encontradas es un indicio de que el consorcio bacteriano tiene la capacidad para generar una mezcla compleja de compuestos con una amplia variedad de cetonas, aldehídos y ácidos orgánicos.

Tabla 4. Reacciones enzimáticas específicas de catabolismos de ácidos grasos libres y aminoácidos. (Escobar-Zepeda et. al., 2016).

Reacción	Enzima	Número EC	ORFs*
L-leucina + 2-oxoglutarato <=> 4-metil-2-oxopentanoato + L-glutamato L-isoleucina + 2-oxoglutarato <=> (S)-3-metil-2-oxopentanoato + L-glutamato L-valina + 2-oxoglutarato <=> 3-metil-2-oxobutanoato + L-glutamato	Transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada[c]	2.6.1.42	50
L-fenilalanina + piruvato <=> fenilpiruvato + L-alanina	Transaminasa de fenilalanina (histidina)[c]	2.6.1.58	11
2-oxo ácido <=> aldehído + CO_2	**Alfa cetoácido carboxilasa[a]**	4.1.1.1	6
L-treonina <=> glicina+ acetaldehído	L-treonina aldolasa[c]	4.1.2.48	3
Tirosina → tiramina +CO_2	Tirosina descarboxilasa[a]	4.1.1.25	3
Metil cetonas (alcan-2-onas) <=> alcan-2-ol	Carbonil reductasa I[a]	1.1.1.184	6
2-xileno →2,3-dimetilfenol + 3,4-dimetilfenol	Fenol 2-mono oxigenasa[b]	1.14.13.7	10
Aldehído + NAD(+) → carboxilato + NADH	Aldehído deshidrogenasa[a]	1.2.1.3	79
Alcohol + NAD(+) <=> aldehído o cetona + NADH Alcohol secundario + NAD(+) <=> cetona + NADH	Alcohol deshidrogenasa[c]	1.1.1.1	122
(S)-metilmalonil-CoA + piruvato <=> propanoil-CoA + oxaloacetate	**Metilmalonil-CoA carboxitransferasa[a]**	2.1.3.1	5

* Indica número de ORFs con anotación para dicha enzima en la tabla de anotación global.

a) McSweeney et al., 2004; b) Urbach et al., 1997; c) Yvon et al., 2001.

Búsqueda de bacteriocinas y genes relacionados

El desarrollo de LAB en sí mismo implica la inhibición de microorganismos indeseables y su habilidad para producir

bacteriocinas es de importancia básica en estrategias de bioconservación en alimentos extendiendo la vida de anaquel y mejorando la seguridad del mismo (Ross et al., 2002). El método utilizado en este trabajo para la identificación de clusters de genes relacionados con bacteriocinas permitió la identificación de un total de 126 contigs de diferentes tamaños que contenían al menos un gen con la anotación de interés (Tabla 5), de los cuales, 43 tuvieron al menos un gen codificante para bacteriocina, 74 tuvieron sólo genes con anotación de proteínas de inmunidad pero sin el gen de la bacteriocina y sólo en 17 fue posible identificar tanto el gen de la bacteriocina como para su respectiva inmunidad. Por otro lado, nueve contigs tuvieron genes relacionados con la síntesis de lantibióticos pero el gen codificante de la bacteriocina no fue encontrado. El resto de los ORFs tuvieron anotación para bacteriocinas de la clase II, es decir no lantibióticos, de los cuáles, la mayoría pertenecen a la subclase IIa de tipo pediocinas, o a la subclase IIc de bacteriocinas circulares (Cotter et al., 2005), en la que se incluye a la subtolisina A. Los genes con anotación de bacteriocina tipo lactococcina que incluye proteínas lineales de un sólo péptido no del tipo de las pediocinas, como las lactococcinas A y B (Nes et al., 2006) se consideran dentro de la clase IId (Cotter et al., 2005). También 9 de las 10 bacteriocinas detectadas con BAGEL3 fueron de clase II: cuatro fueron clasificadas como IIb, conformadas por dos péptidos; cuatro como de clase IId constituidas por un sólo péptido que no es del tipo pediocina; una fue identificada sólo como de clase II, sin subclase, y otra más como putativa.

De los 52 genes estructurales para bacteriocinas identificados en el metagenoma del queso Cotija RO, sólo uno fue de clase I, es decir latibiótico (Tabla 5). El contig en el que se encontró tuvo en la vecindad dos genes relacionados con la biosíntesis de lantibióticos, una proteína de la familia RepB y otros tres genes sin anotación clara que podrían estar asociados con el sistema de secreción de lantibioticos que suelen transcribirse en unidades múltiples de tres o cuatro genes (Kotelnikova y Gelfand, 2002). Un tipo de bacteriocina encontrada en el metagenoma del queso que no entra en ninguna de las clasificaciones aceptadas actualmente son las lactococcinas 972, descritas como un homodímero que actúa inhibiendo la síntesis del septum durante la división celular en lugar de formar poros en la membrana como es el mecanismo clásico de acción de las bacteriocinas de clase II (Martínez et al., 1996).

Tabla 5. Identificadores de Pfam usados en la búsqueda de bacteriocinas. (Escobar-Zepeda et. al., 2016).

Pfam	Descripción del dominio	Coincidencias en tabla*
PF02052	Gallidermina	1
PF01721	Bacteriocina de clase II	12
PF10439	Bacteriocina de clase II con péptido líder de doble glicina	15
PF08951	Inmunidad de enterocina A	88
PF05147	Lantionina sintetasa tipo C	3
PF04369	Familia de las de tipo lactococcinas	7
PF04738	Amino terminal de lantibiótico deshidratasa	3
PF04737	Amino terminal de lantibiótico deshidratasa	3
PF13376	YdeI o OmpD, asociado a protección a bacteriocinas	13
PF12173	Bacteriocina cíclica de clase IIc tipo gasericina A	2
PF11420	Bacteriocina subtilosina A	2
PF09683	Bacteriocina lactococcina 972	3

* Indica número de ORFs con anotación para dicha enzima en la tabla de anotación global.

En general, la anotación de los genes que forman parte de los clusters encontrados en el metagenomas del queso Cotija RO y que tienen anotación diferente a genes de inmunidad, bacteriocinas o síntesis, entran en alguna de las siguientes descripciones de acuerdo a las etiquetas de sus dominios de Pfam: 1) Proteínas de transporte: transportador ABC o proteína de secreción de la familia HylD; 2) Peptidasas: C39 o S49; 3) Sistema de regulación de dos componentes: receptor de regulación de la respuesta, histidina cinasa, regulador de la transcripción o proteínas de transducción de señales; 4) Genes asociados a transferencia horizontal: conjugación, integrasas de fagos, resolvasas o transposasas; 5) Antídotos a toxinas e inhibidores del crecimiento; 6) Proteínas de respuesta a estrés: proteína universal de respuesta a estrés, respuesta a estrés osmótico o respuesta a estrés alcalino; 7) Replicación de ADN; 8) Genes putativos o sin anotación. La presencia de estos genes se puede explicar desde el punto de vista del bioprocesamiento de la bacteriocina. Las peptidasas y transportadores de membrana se requieren para la escisión del péptido señal con el fin de exportar y activar a la bacteriocina

en un sólo paso, por esta razón es común encontrar en la vecindad de la bacteriocina genes que codifican para proteínas que tienen ambos dominios (Ennahar et al., 2000). También se han reportado bacteriocinas de clase II sin péptido señal que no necesitan dicho procesamiento (Nes et al., 2006). La presencia de genes de regulación también se espera en el cluster, ya que la expresión de los genes codificantes de bacteriocinas está regulada y es dependiente de la presencia de señales de *quorum sensing*. Dicha regulación se basa en sistemas de dos componentes de transducción de señales que consiste en una cinasa de histidina unida a membrana y un regulador de respuesta que se activa gracias a la presencia de factores de inducción de prepéptido, que son a nivel de secuencia parecidos a las bacteriocinas pero con mucha menor o nula actividad que forman parte del cluster (Ennahar et al., 2000; Snyder y Worobo, 2014).

Además de peptidasas, transportadores, genes de regulación y los genes estructurales y de inmunidad, el resto de las anotaciones son dispensables del cluster aunque aparezcan con relativa frecuencia. Tal es el caso de los genes relacionados con transferencia horizontal cuya presencia en el cluster tiene lógica dado que los genes de bacteriocinas y su procesamiento suelen estar codificados en plásmidos, cromosomas y/o transposones (Klaenhammer, 1993), y su susceptibilidad a ser transferidos horizontalmente es muy alta entre las bacterias lácticas presentes en alimentos fermentados (Rossi et al., 2014). Es probable que, en cada evento de transferencia horizontal, la célula donadora se deshaga de un set de genes que confiere más de una ventaja a la receptora si estos se encuentran físicamente próximos en el genoma ya sea formando parte de un operón o de un cluster (Lawrence y Roth, 1996). Esto podría explicar la presencia de genes relacionados con respuesta a estrés, antídotos a toxinas y en general aquellas que inhiben el crecimiento de otras bacterias.

Por otro lado, se esperaba observar el gen de la proteína de inmunidad río abajo del gen estructural de la bacteriocina ya que ambos genes son comúnmente cotranscritos y por lo general se reportan en este orden dentro del cluster (Kjos et al., 2011), pero esto no ocurrió en la mayoría de los casos. Sin embargo, así como se encontró una amplia variedad de genes codificantes con anotaciones diversas en la vecindad de los genes de bacteriocinas y de inmunidad sin un patrón definido de sintenia ni presencia de genes, también hubo muchos casos de genes sin anotación o hipotéticos. Éstos son de especial interés sobre todo en los casos de clusters donde sólo se encontró el gen estructural de la bacteriocina sin el gen de inmunidad o viceversa, y más aún si la proteína hipotética se encontraba flanqueando dicho gen, lo que nos lleva a suponer la presencia de genes de inmunidad o bacteriocinas con estructura primaria nueva, que fue imposible anotar por similitud con el método utilizado.

Adicionalmente, se observó una cantidad desproporcionada de genes de inmunidad (104 en total) con respecto al número de genes con anotación de bacteriocinas (52 incluyendo las de BAGEL3) y en muchos casos éstos no estaban flanqueados por secuencias de genes sin anotación lo que implica que posiblemente las proteínas de inmunidad son tan útiles o más que la propia bacteriocina, es decir, el hecho de poseer una batería de genes de inmunidad en el genoma implica una ventaja real para la cepa que la posee aun cuando no sea productora de bacteriocinas. Se observó de hecho un caso particular donde el contig contenía cuatro copias del gen de inmunidad y ningún gen codificante para la bacteriocina. El fenómeno observado en este metagenoma se relaciona con lo que se conoce como inmunidad cruzada, es decir que los microorganismos productores de bacteriocinas son también propietarios de genes que podrían conferirles inmunidad contra otras bacteriocinas (Kjos et al., 2010). Además, se ha reportado que cepas no productoras pueden poseer genes de inmunidad que son probablemente remanentes de clusters de genes de bacteriocinas y que podrían hacer a las cepas resistentes si se expresan adecuadamente (Fimland et al., 2002; Møretrø et al., 2005). Dicho fenómeno ha sido descrito como mimetismo de inmunidad, y se refiere a la resistencia observada en las cepas que no son productoras de bacteriocinas que poseen genes de inmunidad o a la inmunidad obtenida como consecuencia de la producción de una bacteriocina estrechamente relacionada con otra, es decir que el mimetismo puede ser resultado de la posesión o adquisición de genes de inmunidad homólogos (Draper et al., 2009). Dada la alta frecuencia de genes de inmunidad no asociados a genes estructurales de bacteriocinas y sin proteínas hipotéticas adyacentes, el mimetismo de inmunidad podría jugar un papel importante como estrategia de sobrevivencia para las cepas bacterianas exitosas presentes al tiempo final de la maduración del queso Cotija RO.

Reconstrucción de genomas de las especies dominantes

Debido a que el metagenoma fue secuenciado con alta profundidad, fue posible reconstruir los genomas de las tres especies dominantes, cada uno en diferente número de fragmentos. La cobertura estimada en todos los casos es de más de 1400 veces y en ningún caso el número de gaps reales o de cobertura cero fue de más de 78 (Tabla 6) y como se tuvieron cubiertas casi por completo las referencias y los *contigs* fueron orientados sobre las mismas, todas las reconstrucciones se encuentran a nivel de *draft* de alta calidad (Chain et al., 2009). Los porcentajes de lecturas mapeadas en todos los casos son consistentes con la abundancia relativa de dichas especies estimada mediante la proporción de marcadores filogenéticos (Tabla 1).

Tabla 6. Estadísticas de la reconstrucción de genomas de especies dominantes en queso Cotija RO. (Escobar-Zepeda et. al., 2016).

	L. plantarum WCFS1	*L. mesenteroides* ATCC 8293	*W. paramesenteroides* ATCC 33313
Lecturas mapeadas (%)	38.74	11.27	26.85
Cobertura estimada	1,863 x	1,473 x	2,135 x
Número total de contigs	1,560	297	992
Número de gaps no empalmados	78	40	42
N50 / N90 (bp)	4,985 / 825	36,455 / 2,977	3,148 / 1,002
Tamaño promedio de contig	2,201	6,744	2,196
Contenido de GC (%)	44.37	37.90	38.27
Número de genes	3,998	2,141	2,755

Con el fin de establecer si las especies dominantes en el metagenoma son potenciales productores importantes de bacteriocinas, se hizo una búsqueda de los clusters de genes con dicha anotación en los contigs utilizados en la reconstrucción de los genomas. De esta búsqueda resultó que el genoma reconstruido de *W. paramesenteroides* no contiene regiones genómicas codificantes para bacteriocinas ni genes de inmunidad o algún otro relacionado. Por otro lado, en el genoma de *L. mesenteroides* se identificó un cluster con una bacteriocina putativa acompañada de siete ORFs de proteínas hipotéticas adyacentes, además de dos clusters más con genes de inmunidad, pero sin gen codificante para la bacteriocina. Finalmente, en el genoma de *L. plantarum* no se encontraron genes con anotación para bacteriocinas, pero sí se identificaron 11 genes en diferentes contigs con anotación para proteínas de inmunidad donde sólo uno de ellos tuvo proteínas hipotéticas adyacentes. De cualquier modo, sería necesario realizar trabajo experimental para corroborar que alguno de estos genes corresponde a una bacteriocina nueva.

En conclusión, la microbiota bacteriana del queso Cotija RO a los tres meses de maduración está conformada casi en su totalidad por *Firmicutes* y tres géneros son los dominantes: *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Weissella,* cuyos genomas se reconstruyeron con un alto grado de integridad. La dominancia de *Leuconostoc* y *Weissella* es atípica en los quesos madurados, por lo que su presencia y abundancia pueden ser considerados como una firma distintiva del queso Cotija RO. Se observó que el metagenoma de este queso está compuesto por más de 500 taxa no dominantes, entre los que se incluyen bacterias y arqueas halófilas, lo que refleja la complejidad de la comunidad y lo infructuoso que resultaría intentar diseñar un cultivo iniciador para elaborar un queso idéntico fuera de la región de origen. La alta profundidad de secuenciación permitió corroborar que el

alimento está libre de bacterias patógenas y que las cuentas de coliformes están dentro de lo establecido por las normas, es decir que el consumo del queso Cotija RO no representa un riesgo para la salud del consumidor, aun cuando es elaborado con leche no pasteurizada. El consorcio posee el potencial metabólico para generar una mezcla de compuestos a partir del catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada y ácidos grasos libres, principalmente, así como de una gran variedad de aldehídos y alcoholes, que en conjunto forman parte del perfil sensorial del queso. Ninguna de las especies dominantes posee un arsenal importante de genes codificantes para bacteriocinas; sin embargo, dentro del consorcio existe una amplia variedad de genes que codifican para proteínas de inmunidad a bacteriocinas, lo que sugiere que ésta es una estrategia de sobrevivencia para las bacterias de la microbiota del producto madurado.

Referencias

Álvarez, B., Barragán, L., Chombo, M. (2005) Reglas de uso: marca colectiva: queso Cotija: Región de Origen. Asociación Regional de Productores. El Colegio de Michoacán, México.

Asnicar, F., Weingart, G., Tickle, T.L., Huttenhower, C., Segata, N. (2015) Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn. *PeerJ* 3:e1029. doi:10.7717/peerj.1029.

Assefa, S., Keane, T.M., Otto, T.D., Newbold, C., Berriman, M. (2009) ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. *Bioinformatics* 25: 1968–1969. doi:10.1093/bioinformatics/btp347.

Bautista-Gallego, J., Alessandria, V., Fontana, M., Bisotti, S., Taricco, S., Dolci, P., Cocolin, L., Rantsiou, K. (2014) Diversity and functional characterization of Lactobacillus spp. isolated throughout the ripening of a hard cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 181: 60–66. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.020 .

Beresford, T., Williams, A. (2004) The Microbiology of Cheese Ripening, in: Patrick F. Fox, P.L.H.M., Timothy M. Cogan and Timothy P. Guinee (Ed.), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. Academic Press, pp. 287–317.

Björkroth, J., Holzapfel, W. (2006) Genera Leuconostoc, Oenococcus and Weissella, in: Dr, M.D.P., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), The Prokaryotes. Springer US, pp. 267–319.

Bonilla-Rosso, G., Eguiarte, L.E., Romero, D., Travisano, M., Souza, V. (2012) Understanding microbial community diversity metrics derived from metagenomes: performance evaluation using simulated data sets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82: 37–49.

doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01405.x.

Bravo, M.A. (2008) Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas de queso Cotija. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

Broadbent, J.R., Steele, J.L. (2005) Lactic acid bacteria genomics and cheese flavor. *ASM News* 71: 121–128.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L. (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10: 421. doi:10.1186/1471-2105-10-421.

Centeno, J.A., Tomillo, F.J., Fernández-García, E., Gaya, P., Nuñez, M. (2002) Effect of Wild Strains of *Lactococcus lactis* on the volatile profile and the sensory characteristics of ewes' raw milk cheese. *J. Dairy Sci.* 85: 3164–3172. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74404-4.

Chain, P.S.G., Grafham, D.V., Fulton, R.S., FitzGerald, M.G., Hostetler, J., Muzny, D., Ali, J., Birren, B., Bruce, D.C., Buhay, C., Cole, J.R., Ding, Y., Dugan, S., Field, D., Garrity, G.M., Gibbs, R., Graves, T., Han, C.S., Harrison, S.H., Highlander, S., Hugenholtz, P., Khouri, H.M., Kodira, C.D., Kolker, E., Kyrpides, N.C., Lang, D., Lapidus, A., Malfatti, S.A., Markowitz, V., Metha, T., Nelson, K.E., Parkhill, J., Pitluck, S., Qin, X., Read, T.D., Schmutz, J., Sozhamannan, S., Sterk, P., Strausberg, R.L., Sutton, G., Thomson, N.R., Tiedje, J.M., Weinstock, G., Wollam, A., Detter, J.C. (2009) Genome Project Standards in a New Era of Sequencing. *Science* 326: 236-7. doi:10.1126/science.1180614

Chombo-Morales, P., Kirchmayr, M., Gschaedler, A., Lugo-Cervantes, E., Villanueva-Rodríguez, S. (2016) Effects of controlling ripening conditions on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE. *LWT - Food Sci. Technol.* 65: 1153–1161. doi:10.1016/j.lwt.2015.09.044

Cilia, V., Lafay, B., Christen, R. (1996) Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Mol. Biol. Evol.* 13: 451–461.

Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G. (2003) Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy J.* 13: 841–866. doi:10.1016/S0958-6946(03)00109-2.

Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 777–788. doi:10.1038/nrmicro1273.

Czerny, M., Brueckner, R., Kirchhoff, E., Schmitt, R., Buettner, A. (2011) The

influence of molecular structure on odor qualities and odor detection thresholds of volatile alkylated phenols. *Chem. Senses* 36: 539–553. doi:10.1093/chemse/bjr009.

Draper, L.A., Grainger, K., Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2009) Cross-immunity and immune mimicry as mechanisms of resistance to the lantibiotic lacticin 3147. *Mol. Microbiol*. 71: 1043–1054. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06590.x.

Dugat-Bony, E., Straub, C., Teissandier, A., Onésime, D., Loux, V., Monnet, C., Irlinger, F., Landaud, S., Leclercq-Perlat, M.-N., Bento, P., Fraud, S., Gibrat, J.-F., Aubert, J., Fer, F., Guédon, E., Pons, N., Kennedy, S., Beckerich, J.-M., Swennen, D., Bonnarme, P. (2015) Overview of a surface-ripened cheese community functioning by meta-omics analyses. *PloS One* 10: e0124360. doi:10.1371/journal.pone.0124360.

Duthoit, F., Godon, J.-J., Montel, M.-C. (2003) Bacterial community dynamics during production of Registered Designation of Origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single strand conformation polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3840–3848. doi:10.1128/AEM.69.7.3840-3848.2003

Eddy, S.R. (2011) Accelerated profile HMM searches. *PLoS Comput Biol* 7: e1002195. doi:10.1371/journal.pcbi.1002195.

Edgar, R.C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. (2000) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 85–106. doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00534.x.

Ercolini, D., De Filippis, F., La Storia, A., Iacono, M. (2012) "Remake" by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water buffalo mozzarella cheese. *Appl. Environ. Microbiol*. 78, 8142–8145. doi:10.1128/AEM.02218-12.

Escobar, Z.A., 2012. Estudio de la distribución espacial de la microbiota bacteriana en queso Cotija por la técnica de FISH. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., Quirasco Baruch, M. (2016) Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiol.* 57: 116–127. doi:10.1016/j.fm.2016.02.004.

Estrada-Garcia, T., Perez-Martinez, I., Bernal-Reynaga, R., Zaidi, M.B. (2014) Enteroaggregative coli: A Pathogen Bridging the North and South. *Curr. Trop. Med. Rep.* 1: 88–96. doi:10.1007/s40475-014-0018-7.

Fimland, G., Eijsink, V.G.H., Nissen-Meyer, J. (2002) Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiol.* 148: 3661–3670.

Fox, G.E., Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P. (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 166–170.

Fuka, M.M., Wallisch, S., Engel, M., Welzl, G., Havranek, J., Schloter, M. (2013) Dynamics of bacterial communities during the ripening process of different Croatian cheese types derived from raw ewe's milk cheeses. *PLoS ONE* 8 (11) doi:10.1371/journal.pone.0080734.

García, S.V. (2011) Detección de microorganismos lipolíticos durante las etapas de elaboración de un queso artesanal, mediante técnicas moleculares. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

García, S.V., 2006. Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolitica del queso Cotija Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B.W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., Regev, A. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol*. 29: 644–652. doi:10.1038/nbt.1883.

Hernández, M.N. (2007) Identificación de bacterias proteolíticas aisladas de queso Cotija, un estudio microbiológico y fisicoquímico. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

Ishikawa, M., Kodama, K., Yasuda, H., Okamoto-Kainuma, A., Koizumi, K., Yamasato, K., 2007. Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses. *Lett. Appl. Microbiol.* 44: 308–313. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02073.x.

Ishikawa, M., K., Kodama, K., Yasuda, H., Matsuyama, M., Okamoto-Kainuma, A., Koizumi, Y. (2013) *Alkalibacterium gilvum* sp. nov., slightly halophilic and alkaliphilic lactic acid bacterium isolated from soft and semi-hard cheeses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 63: 1471–1478. doi:10.1099/ijs.0.042556-0.

Kanehisa, M., Sato, Y., Morishima, K. (2016) BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J. Mol. Biol.* 428: 726–731. doi:10.1016/j.jmb.2015.11.006.

Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D.J., Holo, H., Cintas, L.M., Snipen, L., Hernández, P.E., Nes, I.F., Diep, D.B. (2011) Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 157: 3256–3267. doi:10.1099/mic.0.052571-0.

Kjos, M., Snipen, L., Salehian, Z., Nes, I.F., Diep, D.B. (2010) The Abi proteins and their involvement in bacteriocin self-immunity. *J. Bacteriol.* 192: 2068–2076. doi:10.1128/JB.01553-09.

Klaenhammer, T.R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39–85.

Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M., Schmidt, T.M. (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1328–1333.

Kotelnikova, E.A., Gelfand, M.S. (2002) Bacteriocin production by Gram-positive bacteria and the mechanisms of transcriptional regulation. *Russ. J. Genet.* 38: 628–641. doi:10.1023/A:1016035700012.

Kultima, J.R., Sunagawa, S., Li, J., Chen, W., Chen, H., Mende, D.R., Arumugam, M., Pan, Q., Liu, B., Qin, J., Wang, J., Bork, P. (2012) MOCAT: A metagenomics assembly and gene prediction toolkit. *PLoS ONE* 7: e47656. doi:10.1371/journal.pone.0047656.

Lawrence, J.G., Roth, J.R. (1996) Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics* 143: 1843–1860.

Li, H., Durbin, R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25: 1754–1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324.

Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. (2014) The microfloras of traditional Greek cheeses, in: Donnelly, C. (Ed.), Cheese and Microbes. ASM Press, Washington, DC. Pp. 177-218.

Martínez, B., Suárez, J.E., Rodríguez, A. (1996) Lactococcin 972 : a homodimeric lactococcal bacteriocin whose primary target is not the plasma membrane. *Microbiol.* 142 (Pt 9): 2393–2398. doi:10.1099/00221287-142-9-2393.

Masoud, W., Vogensen, F.K., Lillevang, S., Abu Al-Soud, W., Sørensen, S.J., Jakobsen, M. (2012) The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 153: 192–202. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.014 .

McMurdie, P.J., Holmes, S. (2013) Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8: e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217.

McSweeney, P.L.H. (2004) Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 57: 127–144. doi:10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x.

Milesi, M. M., McSweeney, P. L. H., Hynes, E. (2008) Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of *Lactobacillus plantarum* in two model cheese systems: Cheddar cheese-type and soft-cheese type. *J. Appl. Microbiol.* 105: 884–892. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03813.x.

Morales, F., Morales, J.I., Hernández, C.H., Hernández-Sánchez, H. (2011) Isolation and partial characterization of halotolerant lactic acid bacteria from two Mexican cheeses. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164: 889–905. doi:10.1007/s12010-011-9182-6.

Møretrø, T., Naterstad, K., Wang, E., Aasen, I.M., Chaillou, S., Zagorec, M., Axelsson, L. (2005) Sakacin P non-producing *Lactobacillus sakei* strains contain homologues of the sakacin P gene cluster. *Res. Microbiol.* 156: 949–960. doi:10.1016/j.resmic.2005.05.005.

Nes, I.F., Brede, D.A., Holo, H, (2006) Chapter 17 - The Nonlantibiotic Heat-Stable Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria, in: Kastin, A.J. (Ed.), Handbook of Biologically Active Peptides. Academic Press, Burlington, pp. 107–114.

NMX-F-735-COFOCALEC (2011) Norma Mexicana. Sistema producto Leche-Alimentos-Lácteos-Alimento Lácteo Regional-Queso Cotija Artesanal Madurado-Denominacion, Especificaciones y Métodos de Prueba.

NOM-243-SSA1 (2010) Norma Oficial Mexicana. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

Peng, Y., Leung, H.C.M., Yiu, S.M., Chin, F.Y.L. (2012) IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics* 28: 1420–1428. doi:10.1093/bioinformatics/bts174.

Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. (2012) High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 5717–5723. doi:10.1128/AEM.00918-12.

Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 3–16.

Rossi, F., Rizzotti, L., Felis, G.E., Torriani, S. (2014) Horizontal gene transfer among microorganisms in food: current knowledge and future perspectives. *Food Microbiol.* 42: 232–243. doi:10.1016/j.fm.2014.04.004.

Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M. (2005) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 591–610. doi:10.1016/j.femsre.2005.04.002.

Snyder, A.B., Worobo, R.W. (2014) Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *J. Sci. Food Agric.* 94: 28–44. doi:10.1002/jsfa.6293.

Su, X., Pan, W., Song, B., Xu, J., Ning, K. (2014) Parallel-META 2.0: enhanced metagenomic data analysis with functional annotation, high performance computing and advanced visualization. *PloS One* 9: e89323. doi:10.1371/journal.pone.0089323.

Urbach, G. (1997) The flavour of milk and dairy products: II. Cheese: contribution of volatile compounds. *Int. J. Dairy Technol.* 50, 79–89. doi:10.1111/j.1471-0307.1997.tb01743.x.

van Heel, A.J., de Jong, A., Montalbán-López, M., Kok, J., Kuipers, O.P. (2013) BAGEL3: Automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Res.* 41: W448-453. doi:10.1093/nar/gkt391.

Wang, W., Zhang, L., Li, Y. (2012) Production of volatile compounds in reconstituted milk reduced-fat cheese and the physicochemical properties as affected by exopolysaccharide-producing strain. *Molecules* 17: 14393–14408. doi:10.3390/molecules171214393

Wang, Y., Zhang, Z., Ramanan, N. (1997) The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes. *J. Bacteriol.* 179: 3270–3276.

Willner, D., Furlan, M., Haynes, M., Schmieder, R., Angly, F.E., Silva, J., Tammadoni, S., Nosrat, B., Conrad, D., Rohwer, F. (2009) Metagenomic analysis of respiratory tract DNA viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals. *PloS One* 4: e7370. doi:10.1371/journal.pone.0007370.

Wolfe, B.E., Button, J.E., Santarelli, M., Dutton, R.J. (2014) Cheese rind communities provide tractable systems for *in situ* and *in vitro* studies of microbial diversity. *Cell* 158: 422–433. doi:10.1016/j.cell.2014.05.041.

Yvon, M., Rijnen, L. (2001) Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.* 11: 185–201. doi:10.1016/S0958-6946(01)00049-8.

Zhu, W., Lomsadze, A., Borodovsky, M. (2010) *Ab initio* gene identification in metagenomic sequences. *Nucleic Acids Res.* 38: e132–e132. doi:10.1093/nar/gkq275.

Zúñiga, A.B. (2009) Descripción e identificación de la comunidad bacteriana presente en el Cotija por métodos moleculares. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas.

Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

Agradecimientos

Agradecemos a Jerôme Verleyen y Karel Estrada Guerra, de la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática de la UNAM, por su apoyo en el análisis bioinformático y a Verónica Jiménez Jacinto por depositar los datos metagenómicos en el repositorio del NCBI. Así mismo, Agradecemos a la Dra. Carmen Wacher Rodarte y al Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos por sus comentarios y contribuciones a este proyecto. Este trabajo fue apoyado por el PAPIIT IN222115. Alejandra Escobar-Zepeda agradece a CONACyT por la beca de doctorado.

Liberación y concentración de la actividad amilolítica de *Streptococcus infantarius* 25124 aislada del pozol

Carolina Rodríguez-Saavedra[1], Romina Rodríguez-Sanoja[2], Carmen Wacher[1] y Gloria Díaz-Ruiz[1]*

[1]*Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Ciudad de México, México.*

[2]*Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Ciudad de México, México.*

E-mail: gloriadr@unam.mx

RESUMEN

Las amilasas son enzimas con una importancia relevante en diversas industrias cuya obtención a partir de fuentes microbianas, como las bacterias ácido lácticas amilolíticas, ha ido en aumento en los últimos años. Del pozol, un alimento fermentado tradicional mexicano se aisló *Streptococcus infantarius* 25124 (*Sii*-25124), una especie amilolítica que está presente en todo el proceso de fermentación y cuya actividad está asociada a la célula. El objetivo de este trabajo fue diseñar un método para liberar dicha actividad, así como concentrarla. Para ello se utilizó un método enzimático-mecánico. El lisado celular resultante se concentró precipitando con sulfato de amonio y se filtró usando el dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter. Finalmente se obtuvieron dos bandas de enzimas con actividad amilolítica de alto y bajo peso molecular. Estos resultados serán útiles para la caracterización de la actividad amilolítica de *Sii*-25124.

Palabras clave: Pozol, bacterias ácido lácticas amilolíticas, amilasas, *Streptococcus infantarius*

ABSTRACT

Amylases are enzymes with great relevance on a variety of industrial activities. Its production from other microbial sources, such as amylolytic lactic acid bacteria, has been raising in the last years. *Streptococcus infantarius* 25124 (*Sii*-25124) was isolated from pozol, a fermented traditional product from southeast Mexico. It has been found that this amylolytic species is present during the whole fermentation process of pozol and that its enzyme activity is cell-bounded. The objective of this work was to release amylolytic activity and concentrate it. The cells were extracted from pozol, the amylolytic activity was separated from the rest of the cell proteins and it was concentrated using an enzymatic-mechanic method. The resulting cell lysate was concentrated by ammonium sulphate

precipitation and it was filtrated using an Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter device. *Sii*-25124 cell lysate was concentrated 25 times using the enzymatic-mechanic method and this allowed to obtain two starch-degrading enzymes bands of high and low molecular wieghts. These results will be of great utility to continue studying *Sii*-25124 amylolytic activity.

Key words: Pozol, amylolytic lactic acid bacteria, amylases, *Streptococcus infantarius* 25124.

INTRODUCCIÓN

Las amilasas son enzimas con una importancia relevante en la producción de pan, cerveza y alimentos en general, así como en industrias textiles, de papel y de fabricación de detergentes, representando casi el 30% del mercado mundial de enzimas (Quintero *et al*., 2009).

La producción de amilasas se realiza mayoritariamente a través de microorganismos debido a su rentabilidad, consistencia, a los mínimos espacios y tiempos requeridos para la producción y por las facilidades que permite la modificación y mejoramiento del proceso. Las fuentes microbianas más utilizadas son *Bacillus sp*. y *Aspergillus sp.,* siempre y cuando no se trate de especies patógenas como *Bacillus cereus* o *Aspergillus flavus*. Las amilasas producidas por estos microorganismos se usan en la industria de alimentos, debido a su estatus GRAS (Generalmente reconocidos como seguros, por sus siglas en inglés) (Sun *et al*., 2009). En este sentido, es importante conocer más sobre amilasas provenientes de bacterias ácido lácticas amilolíticas que, pese a su amplia distribución en alimentos amiláceos de fermentación espontánea, han sido poco estudiadas. Se han encontrado bacterias ácido lácticas amilolíticas en materias primas ricas en almidón, así como en diversos alimentos fermentados a base de almidón. Ejemplos de esto son *Lactobacillus plantarum* A6, aislada por primera vez de raíces de yuca (Giraud *et al.*, 1991); la especie también es la más frecuentemente encontrada en alimentos y bebidas fermentados a base de almidón, como ogi, mawè o boza, reportando una alta actividad amilolítica (Blandino *et al*., 2003; Petrova *et al*., 2013). *Lactobacillus amylovorus* es otra bacteria ácido láctica amilolítica con alta actividad, aislada de desechos de maíz fermentado para alimentación animal (Nakamura, 1981). La cepa de *Lactobacillus amylophilus* GV6, aislada de desperdicios amiláceos, posee dos amilasas: una extracelular identificada como α-amilasa, y otra asociada a célula identificada como amilopululanasa (Vishnu *et al.,* 2006). Dentro de la especie *Streptococcus* se han reportado cepas amilolíticas, como *S. bovis* JB1 y *S. bovis* 148, ambas aisladas de rumen de bovino. *S. bovis* JB1 cuenta con dos amilasas: una extracelular inducida al crecer la bacteria en medio con maltosa; y otra asociada a célula que se produce cuando *S. bovis* JB1 crece únicamente en presencia de almidón (Freer, 1993). *S. bovis* 148 posee dos α-amilasas: una extracelular y otra

intracelular, de las que únicamente se ha logrado caracterizar ésta última, reportándose un peso molecular de 56.65 KDa (Satoh *et al*., 1993 y 1997).

El pozol es un alimento complejo que no ha sido estudiado completamente y dada su relevancia en el sureste de México como alimento básico de las comunidades ahí establecidas, es importante conocerlo para poder aprovecharlo mejor en beneficio de dichas comunidades. El estudio de la microbiota responsable de la hidrólisis del almidón para obtener azúcares más accesibles que puedan ser fermentados por el resto de los microorganismos es importante. En estudios anteriores (Ampe *et al.*, 1999; Díaz-Ruiz *et al*., 2003), se encontró que *Streptococcus infantarius* es la especie amilolítica que está presente en todo el proceso de fermentación, por lo que es esencial saber cómo actúan la bacteria y la enzima, para tratar de comprender cómo funciona el sistema microbiológico y bioquímico del pozol.

En estudios previos (Díaz Ruiz, 2003; Virgilio, 2005) se encontró, en extractos celulares de la cepa aislada del pozol, *Streptococcus infantarius sp. infantarius* 25124 (*Sii*-25124), que la actividad amilolítica está asociada a la célula. Dado esto, el objetivo de este trabajo fue recuperar de manera soluble la actividad amilolítica de la célula de *Sii* 25124.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacterias utilizadas

Streptococcus infantarius sp. *infantarius* 25124 (*Sii*-25124) fue aislada de muestras de masa nixtamalizada obtenida del mercado de Villahermosa (Díaz-Ruiz *et al*., 2003). La cepa se conservó a -70 °C en caldo DeMan-Rogosa-Sharpe-Almidón-Glicerol (almidón 20 g/L, glicerol 20%). Se reactivaron suspendiendo 50 µl de estas células en 5 ml de caldo DeMan-Rogosa-Sharpe-Almidón (MRS-A). Para obtener el pre-cultivo, las células se incubaron a 30°C durante 24 h y después se suspendieron 5 ml de las células reactivadas. Después de 18 horas de crecimiento a 30°C y agitación a 100 rpm, el pre-cultivo se colocó en un matraz con 15 ml, 25 ml ó 375 ml de caldo MRS-A, incubando a 30°C durante 6 h con agitación a 100 rpm. El cultivo fresco se utilizó en los experimentos.

Ensayo de actividad amilolítica

Para cuantificar la actividad amilolítica de *Sii*-25124 se preparó una solución con 12.5 mg/ml de almidón soluble de papa en buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.8 y se siguió el método de Giraud *et al.* (1993), agregando 50 mM de $CaCl_2$ a la muestra de la enzima. La actividad enzimática se expresó en unidades de actividad amilolítica por mililitro de cultivo (U/ml), misma que se define como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 10 mg de almidón en 30 minutos.

Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

Con el fin de evaluar qué tan eficiente fue la liberación de la actividad amilolítica de *Sii*-25124 en las fracciones obtenidas en cada protocolo, se realizaron electroforesis en condiciones desnaturalizantes en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), según el método descrito por Laemmli (1970). Para ello se prepararon geles al 8.0% de 1 mm de espesor, llevando a cabo la migración a 90 V durante 120 minutos. La tinción para observar la presencia de proteínas se realizó con azul de Coomassie Page Blue Protein Stain de Thermo Scientific, mientras que para detectar la actividad amilolítica en los geles se realizó un zimograma, usando el método de extinción del complejo almidón-yodo.

Ensayos de liberación de la actividad amilolítica de Sii-25124

Buffer de extracción. Se obtuvieron 30 ml de cultivo fresco para cosechar las células centrifugando a 10,000 rpm por 15 min a 4° C, se lavaron con Tris-HCl pH 8.0 10 mM para después usar un buffer de extracción (EDTA 10 mM, Tris-HCl pH 8.0 10 mM, NaCl 10 mM y SDS 10% p/v) según la metodología de García-Cano *et al.* (2011). Las muestras obtenidas de este protocolo se sometieron a ensayos de actividad amilolítica.

Liberación enzimático-mecánica. Se evaluaron diferentes buffers con el fin de encontrar cuál de ellos era más eficiente en la obtención de protoplastos con actividad amilolítica. Se usaron buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 0.1 mM) pH 7.9, Tris-HCl (Tris base 50 mM) pH 8.0, MOPS (MOPS 20 mM, acetato de sodio 20 mM y EDTA 1 mM) pH 7.95, buffer de fosfatos 0.1 M pH 8.0 y TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM) pH 7.89. Se partió de 5 cultivos de 50 ml de *Sii*-25124. Se cosecharon las células de cada uno a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, para posteriormente lavar el pellet celular y resuspenderlo en 5 ml de cada buffer a evaluar y centrifugando según lo indicado anteriormente. Después, cada uno de los botones celulares se resuspendió en 2 ml del buffer a evaluar y en seguida se agregó a cada uno 3 ml del buffer correspondiente con 12 mg de lisozima. Se incubaron a 37° C durante una hora y finalmente se recuperaron los sobrenadantes y los pellets de protoplastos por centrifugación. La actividad amilolítica se midió en cada una de las muestras con los diferentes buffers. Una vez que se encontró el mejor buffer para obtener protoplastos con la mayor actividad amilolítica, se utilizó éste para obtener un lisado celular por sonicación. Las células cosechadas de un cultivo de *Sii*-25124 con 6 horas de crecimiento se resuspendieron en buffer TE-sacarosa-lisozima (Tris-EDTA pH 7.9, sacarosa al 25% y lisozima a 4 mg/ml) y se incubó a 37°C por 1 hora para obtener protoplastos de *Sii*-25124 centrifugando a 10,000 rpm por 15 min y 4°C. Los protoplastos se resuspendieron en buffer de lisis (EDTA 5 mM, NaCl 50 mM, buffer de fosfatos pH 6.8 0.1 M, mezcla inhibidora de proteasas 1/100) y se sometieron a una sonda de ultrasonido Sonics Vibra Cell VCX 500 con la que se dieron 5 ciclos, cada uno con 20 segundos de pulsaciones al 20% de amplitud y 20 segundos de enfriamiento. Después, se separó el lisado y los restos celulares vía centrifugación a 10,000 rpm durante 15

minutos, para proceder a realizar un ensayo enzimático en ambas fracciones, así como una electroforesis en condiciones desnaturalizantes y un zimograma.

Ensayos de separación y concentración de la actividad amilolítica de Sii-25124

Precipitación fraccionada con sulfato de amonio. A partir de dos matraces con 500 ml de cultivo se obtuvieron 100 ml de lisado celular según lo descrito anteriormente, aplicando pulsaciones de la sonda de ultrasonido a fracciones de 10 ml. A continuación, se precipitó con sulfato de amonio en fracciones de 30%, 60% y 100%, centrifugando en cada paso a 10,000 rpm por 15 minutos y 4°C para obtener la fracción soluble y la del precipitado. Las fracciones precipitadas se sometieron a diálisis, para lo cual se ocupó una membrana 7 Spectra/Por con tamaño de poro de 50 KDa. Cada fracción se resuspendió en 5 ml de buffer TE 1x y se dializaron contra buffer TE 1x durante 24 horas a 4°C, haciendo cambios de buffer cada 4 horas. Al término del proceso de diálisis se recuperaron las fracciones y cada una se sometió a un ensayo de actividad amilolítica y a una electroforesis en condiciones desnaturalizantes, así como un zimograma.

Uso de dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter. A partir de 500 ml de cultivo fresco de *Sii*-25124 se obtuvieron 25 ml de lisado celular, esto es, un lisado 20 veces concentrado a partir del cultivo original. De este lisado se tomaron 5 ml y se colocaron en un tubo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Device de Merck Millipore con una membrana PLFK Ultracel-PL con tamaño de poro de 100 KDa. El dispositivo con la muestra se centrifugó a 5,000 g durante 75 minutos a temperatura ambiente, obteniéndose 500 µl finales de concentrado. A continuación, tanto el concentrado como el filtrado obtenidos se sometieron a un ensayo de actividad amilolítica y a una electroforesis en condiciones desnaturalizantes y un zimograma.

Concentración por lisis celular. Se procedió a obtener 100, 250 ó 500 ml de cultivo, se obtuvieron protoplastos de cada uno de ellos y cada uno de los botones de protoplastos obtenidos se resuspendieron en 10 ml de buffer de lisis, obteniéndose así diferentes concentraciones de cada uno (10x, 25x y 50x, respectivamente). Se sometieron a 5 ciclos de pulsaciones al 20% de amplitud con 20 segundos de enfriamiento, para finalmente centrifugar a 10,000 rpm durante 15 minutos (lisado a 10x) o a 12,000 rpm durante 20 minutos (lisados a 25x y 50x), ambos a 4°C. Se realizó un ensayo *in vitro* de actividad amilolítica, así como un SDS-PAGE y un zimograma.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos de liberación de la actividad amilolítica de Sii-25124

Dado que se ha encontrado que la actividad amilolítica de *Sii*-25124 está asociada a célula (Díaz-Ruiz, 2003; Virgilio, 2005), se ensayaron diferentes protocolos para liberar dicha actividad de forma soluble.

Para lo cual, se siguió el protocolo descrito por García-Cano *et al*. (2011). Los resultados, que se muestran en la tabla 1, indicaron que la liberación de la actividad amilolítica a través de este protocolo no fue eficiente, de un total de 14.745±2.4 U/ml actividad amilolítica en las células resuspendidas de *Sii*-25124, se obtuvo un 5.25% en los restos celulares, mientras que sólo se logró un 16.9% después de dializar durante 44 horas la fracción soluble. El buffer de extracción preparado a concentraciones relativamente elevadas de SDS pudo ser un factor determinante en la recuperación de la actividad amilolítica, ya que pudo no haber sido eliminado por completo. Se sabe que el SDS causa la desnaturalización de las proteínas debido al desdoblamiento de éstas por las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas alquiladas del grupo dodecil sulfóxido con los grupos apolares de los residuos de aminoácidos, así como algunas interacciones iónicas dependiendo de la carga global de la proteína (Bhuyan, 2009). Se ha reportado que la renaturalización de las proteínas tratadas con SDS u otros tensoactivos es factible, siempre y cuando éste sea eliminado por dilución, para lo cual la diálisis es uno de los procesos más recomendados; sin embargo, esta técnica puede fallar debido a que las proteínas se agregan después de la eliminación de la sustancia desnaturalizante (Michaux, *et al*., 2008).

Tabla 1. Actividad amilolítica recuperada en el ensayo con buffer de extracción

	Suspensión celular inicial de *Sii*- 25124	Restos celulares de *Sii*-25124	Sobrenadante dializado		
			24 horas	40 horas	44 horas
Promedio de actividad amilolítica (U/mL)	14.745±2.4	0.774±0.15	0.496±0.41	0.635±0.06	2.5±0.75
Porcentaje recuperado	100%	5.25%	3.36%	4.30	16.9%

Para realizar la extracción enzimático-mecánica se buscó el mejor buffer para liberar la actividad amilolítica de forma soluble. En la tabla 2 se muestran los resultados de la actividad amilolítica recuperada en las diferentes fracciones (suspensión celular inicial, restos celulares y fracción soluble), con los diferentes buffers evaluados. Como se puede observar, la mejor liberación se obtuvo usando el buffer Tris-EDTA pH 7.9, ya que se

obtuvieron 3.73±1.62 U/ml de actividad, lo que correspondió al 71.6% de la actividad total de la suspensión celular inicial (5.21±0.32 U/ml); mientras que en la fracción de los restos celulares se obtuvo un 48.75% de la actividad. La recuperación lograda con el resto de los buffers no superó en ningún caso el 20% de la actividad inicial: 9.36% para buffer de fosfatos, 16.16% para buffer TAE, 13.65% para buffer Tris-HCl y 8.1% para buffer MOPS.

Tabla 2. Evaluación del buffer a usar para la liberación de la actividad amilolítica

	Buffers evaluados				
	Fosfatos pH 8.0	TE pH 7.9	TAE pH 7.89	Tris-HCl pH 8.0	MOPS pH 7.95
Suspensión celular inicial de *Sii*-25124					
Promedio de Actividad amilolítica (U/ml)	7.839±2.22	5.216±0.32	3.069±1.83	7.273±1.22	5.871±0.95
Porcentaje recuperado	100%	100%	100%	100%	100%
Fracción soluble					
Promedio de Actividad amilolítica (U/ml)	0.734±0.5	**3.735±1.62**	0.496±0.55	0.993±0.35	0.476±0.3
Porcentaje recuperado	9.36%	**71.6%**	16.16%	13.65	8.10
Restos celulares de *Sii*-25124					
Promedio de Actividad amilolítica	3.636±0.52	2.543±1.14	0.933±0.4	6.436±0.48	1.51±0.03
Porcentaje recuperado	49.2%	48.75%	30.4%	88.5%	25.7%

Con este resultado, se aplicó la liberación enzimático-mecánica, en la que se usó el buffer TE-sacarosa-lisozima, con el fin de obtener protoplastos por degradación de pared celular. Esto generalmente se realiza con lisozima por ser un método suave que no genera daño por aumento de temperatura, oxidación o cortes en las proteínas (Grabski, 2009). La lisozima actúa hidrolizando los enlaces glicosídicos del ácido murámico

presente en la pared celular de bacterias Gram positivas (Lee & Yang, 2002), lo que da como resultado protoplastos o bacterias desprovistas de pared celular, las cuales son altamente sensibles y susceptibles a citólisis en medios hipotónicos o ante efectos mecánicos bruscos como la sonicación (Lederberg, 1956; Brenner *et al*., 1958). En la tabla 3 se muestran los resultados de la liberación enzimática tras aplicar el método enzimático-mecánico con lisozima y una sonda de ultrasonido. Al inicio, las células de *Sii*-25124 mostraron una actividad de 9.38±0.56 U/ml (100%). Después, el tratamiento con lisozima degradó la pared celular de las células de *Sii*-25124, generando protoplastos que arrojaron una actividad de 8.17±0.41 U/ml (87.1%). La fracción soluble obtenida tras la obtención de protoplastos (recuperados por centrifugación), no presentó actividad amilolítica (datos no reportados), lo que corrobora que dicha actividad se encuentra asociada a membrana y no a pared celular (Díaz-Ruiz, 2003). Finalmente, la aplicación de la sonda de ultrasonido dio como resultado una actividad de 8.9±0.47 U/ml en la fracción soluble (94.9%) y de 1.03±1.41 U/ml en los restos celulares (fracción insoluble).

Tabla 3. Actividad amilolítica recuperada en cada fracción obtenida por el método enzimático-mecánico.

	Suspensión celularinicial de *Sii*-25124	Protoplastos	Lisado	Restos celulares
Act. amilolítica (U/ml)	9.383±0.56	8.174±0.41	8.906±0.47	1.038±1.41
% Recuperado	100%	87.1%	94.9%	11.06%

En la figura 1 se muestra la electroforesis en condiciones desnaturalizantes, así como el zimograma del mismo. En el zimograma se observa la actividad amilolítica correspondiente a una banda de alto peso molecular, aproximadamente 250 KDa, lo cual coincide con reportes anteriores sobre la actividad amilolítica de *Sii*-25124 (Díaz-Ruiz, 2003; Virgilio, 2005). Sin embargo, en el gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie no se logró visualizar la banda correspondiente a la del zimograma. El método de tinción por Coomassie tiene una sensibilidad que oscila entre 0.1 µg a 0.5 µg de proteína; incluso los métodos más sensibles que utilizan la tinción con Coomassie coloidal G-250 no superan la sensibilidad de la tinción con plata, pues logran detectar de 10 a 1 ng de proteína

(Dyballa & Metzger, 2009). El no visualizar una banda de proteína que correspondiera a la banda de actividad amilolítica en el gel SDS-PAGE evidenció que la cantidad de proteína presente en el lisado celular fue poca y requería ser concentrada. No así con la actividad, ya que el método usado para realizar el zimograma fue lo suficientemente sensible para generar una banda de actividad clara. Por tanto, los ensayos subsecuentes se enfocaron en concentrar la enzima responsable de la actividad con el fin de visualizarla y poder realizar experimentos de caracterización.

Ensayos de concentración de la actividad amilolítica de Sii-25124

Precipitación fraccionada con sulfato de amonio. El lisado celular de *Sii*-25124 fue fraccionado con concentraciones crecientes de sulfato de amonio, utilizando concentraciones de 30, 60 y 100%, con el fin de encontrar el rango en el que la actividad amilolítica se enriqueciera en la fracción insoluble, resuspender esta fracción y concentrar la actividad amilolítica. Se observó una recuperación de la actividad amilolítica en el lisado celular, logrando un enriquecimiento de 1.4 veces (tabla 4). Con el primer fraccionamiento con sulfato de amonio no precipitó actividad amilolítica y después del fraccionamiento al 100% no se enriqueció lo suficiente (0.7 veces de enriquecimiento). El fraccionamiento a 60% de sulfato de amonio fue el único que mostró un enriquecimiento mayor (1.18); sin embargo, fue más bajo que el obtenido con el lisado celular. La proteína recuperada por diálisis presentó un precipitado. Este procedimiento fue crítico para la integridad de la amilasa de *Sii*-25124 al eliminar el sulfato de amonio. Se ha reportado que puede ocurrir la agregación de proteínas si no se siguen las condiciones adecuadas, siendo las más críticas el tipo de buffer utilizado y la temperatura (Pesarrodona *et al*., 2015).

El gel obtenido de este ensayo se muestra en la figura 2. En él se puede observar que no fue posible visualizar la proteína correspondiente con la banda de actividad del zimograma, indicando que no se logró concentrar la proteína. Aunado a esto, en las bandas del zimograma se puede apreciar que la banda de actividad correspondiente a la fracción precipitada del dializado es un poco más intensa que la banda de actividad de la fracción soluble del dializado, corroborando que la proteína precipitó y no pudo recuperarse en la fracción soluble. Por otro lado, no se descarta que en algunos otros puntos del proceso pudieron generarse pérdidas de proteína, por ejemplo, durante la liberación de la amilasa o durante la diálisis. Dado que la actividad amilolítica parece estar asociada a célula, es probable que los cambios de polaridad en el medio, además de los cambios en la concentración de sales o detergentes alteren el comportamiento de agregación y solubilidad de la proteína, fenómeno reportado con anterioridad para otras proteínas asociadas a membrana (Kubicek *et al*., 2014). Así pues, la liberación de la actividad amilolítica por sonicación de la fracción soluble pudo no

haber sido completa, debido a falta de solubilidad o a degradación de la enzima por el mismo proceso de sonicación, ya que también se ha reportado la factibilidad de que éste desnaturalice y agregue proteínas (Stathopulos *et al*., 2004).

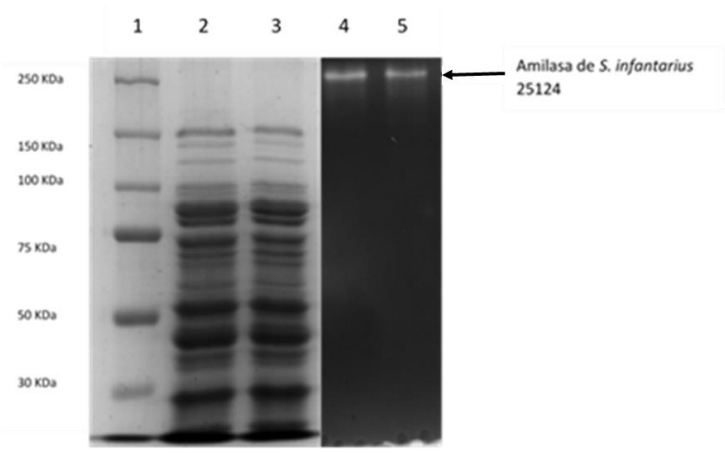

Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) del lisado celular de *Sii*-25124 obtenido por el ensayo enzimático-mecánico, tinción con azul de Coomassie Page Blue Protein Stain de Thermo Scientific. Carril 1: marcador de pesos moleculares; carril 2 y 3 (duplicado): bandas correspondientes al conjunto de diferentes proteínas que están presentes en la fracción soluble del lisado celular de *Sii*- 25124; carriles 4 y 5 (duplicado): banda con actividad amilolítica se observa en la zona superior cercano a los 250 KDa.

Tabla 4. Enriquecimiento de la actividad amilolítica de *Sii*-25124 usando precipitación fraccionada con sulfato de amonio.

Paso de enriquecimiento	Actividad (U/ml)	Volumen total de la fracción (ml)	Actividad Total (U)	Proteína total (mg)	Actividad Específica (U/mg de proteína)	Rendimiento %	Enriquecimiento
Células	10.72±0.1	100	1,072	1128±41.6	0.950	100	1
Protoplastos	13.13±0.156	50	656.5	527±24.42	1.24	61.2	1.3
Lisado	12.11±2.07	100	1,211	865.5±38.67	1.39	112.9	1.4
Restos celulares	1.056±0.18	50	52.8	416±16.05	0.12	4.92	0.12
Fracción 0%-30%	0	10	---	--	---	---	---
Fracción 30%-60%	18.67±2.12	10	186.7	166.5±13.06	1.12	1.74	1.18
Fracción 60%-100%	2.92±1.43	10	29.2	43.8±2.35	0.67	2.72	0.7

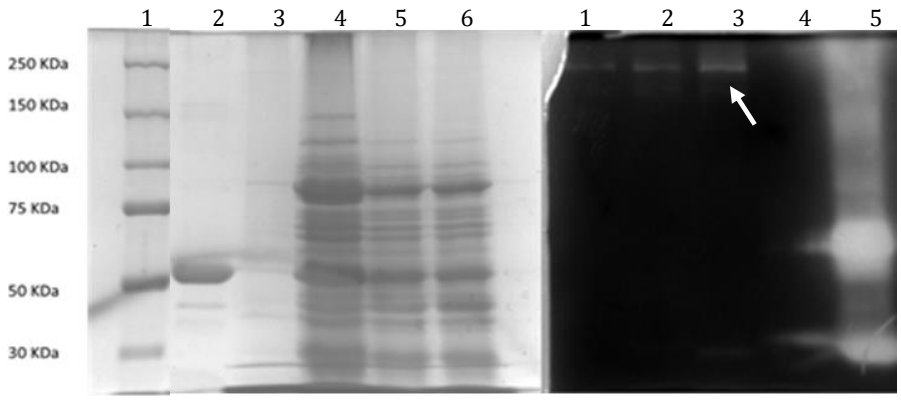

Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de la precipitación con sulfato de amonio del lisado celular de *Sii*-25124. Izquierda: SDS-PAGE, tinción con azul de Coomassie Page Blue Protein Stain de Thermo Scientific. Carril 1: marcador de pesos moleculares; carril 2: amilasa de *Bacillus licheniformis* (Sigma-Aldrich) como control, positivo; carril 3: fracción soluble de la muestra precipitada al 60% de sulfato de amonio y dializada contra buffer TE 1x; carril 4: fracción insoluble de la muestra precipitada al 60% de sulfato de amonio y dializada contra buffer TE 1x; carriles 5 y 6 (duplicado) lisado celular de *Sii*-25124. Derecha: zimograma de actividad amilolítica usando la técnica de extinción del complejo almidón-yodo. La flecha blanca indica la banda de actividad amilolítica de interés. Carriles 1 y 2: (duplicado) lisado celular de *Sii*-25124; carril 3: fracción insoluble de la muestra precipitada al 60% de sulfato de amonio y dializada contra buffer TE 1x; carril 4: fracción soluble de la muestra precipitada al 60% de sulfato de amonio y dializada contra buffer TE 1x; carril 5: amilasa de *Bacillus licheniformis* como control positivo.

Uso de dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter. Con el fin de concentrar y separar la actividad amilolítica de *Sii*-25124, se usó el dispositivo de concentración Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter de Merck Millipore con una membrana de corte molecular de 100 KDa, con lo que se esperaba que, según el patrón de bandas de proteínas observado en el lisado celular (figuras 1 y 2), se lograra eliminar la mayoría, quedando presentes únicamente la banda de aproximadamente 100 kDa (figuras 1 a 3) y esperando poder visualizar la banda de 250 KDa correspondiente a la actividad amilolítica vista en los zimogramas.

En la tabla 5 se presentan los resultados del experimento y se puede observar una buena recuperación de la actividad amilolítica en el lisado celular 20 veces concentrado obteniéndose 13.30±1.45 U/ml, lo que se tradujo en un enriquecimiento de 1.6 veces. Después, el lisado tratado con el dispositivo se concentró recuperando 18.92±3.48 U/ml de actividad amilolítica, siendo un enriquecimiento de 5.96. Sin

embargo, el filtrado también presentó actividad amilolítica considerable de 7.51±1.94 U/ml, lo que podría indicar la presencia de una segunda enzima de bajo peso molecular responsable de la actividad encontrada en esta fracción. En este sentido, cabe resaltar que la presencia de dos amilasas en especies de *Streptococcus* ya ha sido reportada con anterioridad. Satoh *et al.* (1997) reportaron dos amilasas: AmyA y AmyB para *S. bovis* 148, siendo AmyA una α-amilasa extracelular capaz de unirse y degradar el almidón insoluble, producida en mayor proporción que AmyB, una α-amilasa intracelular incapaz de unirse y degradar al almidón insoluble. Por otro lado, *S. bovis* JB1 produce también dos amilasas: una asociada a célula y otra extracelular, producidas por la cepa dependiendo de la fuente de carbono en la que crezca, al crecer en un medio con almidón, 80% de la actividad amilolítica se encuentra asociada a célula; mientras que al crecer en medio con glucosa o maltosa, más del 90% de la actividad amilolítica está en el medio extracelular (Freer, 1993).

Los zimogramas mostraron una banda de actividad de alto peso molecular y no se observó la banda de menor peso (figura 3). Deben considerarse las condiciones desnaturalizantes iniciales con las que son tratadas las proteínas para realizar la electroforesis. Se ha reportado que en ensayos zimográficos, aunque se diluya la concentración de SDS en los geles con buffers de renaturalización, existen proteínas que pierden capacidad para renaturalizarse adecuadamente, pudiendo mostrar una baja o nula actividad en los zimogramas (Cazenave & Toulmé, 2001; Hu & Beeton, 2010); ésta pudo ser la razón de no observar actividad amilolítica en un peso molecular más bajo en los geles de los zimogramas obtenidos hasta el momento. Por otro lado, el gel SDS-PAGE teñido con Coomassie mostró el mismo patrón de bandas que el lisado celular, indicando que no hubo separación en el lisado concentrado, ni se logró la concentración requerida para detectar la banda con la tinción de Coomassie (figura 3). La obstrucción de la membrana del dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter por aglomerados de proteínas puede ser una razón para que la muestra no se haya separado como se esperaba. Se ha reportado que durante procesos de filtración de soluciones proteínicas, éstas tienden a obstruir membranas con tamaños de poro mucho más grandes que el tamaño de las proteínas monoméricas que forma la solución. Esto se atribuye a la presencia de proteínas aglomeradas que pueden ser hasta en tres órdenes de magnitud más grandes que los monómeros, obstruyendo de esta forma los poros de la membrana (Rezaei *et al*., 2014). Los mecanismos de aglomeración proteínica son complejos y se han reportado interacciones membrana-proteína y proteína-proteína, que a su vez dependen también de las condiciones fisicoquímicas de la solución, así como de la estructura y composición de la membrana (Martin *et al.*, 2002).

Tabla 5. Enriquecimiento de la actividad amilolítica de Sii-25124 utilizando el dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter de Merck Millipore.

Paso de enriquecimiento	Actividad (U/ml)	Volumen total de la fracción (ml)	Actividad Total (U)	Proteína total (mg)	Actividad Específica (U/mg de proteína)	Rendimiento %	Enriquecimiento
Células	10.48±3.3	25	264.75	201.1±17.26	1.31	100	1
Protoplastos	13.32±0.29	25	334.5	193.3±29.26	1.73	126.3	1.3
Lisado	13.30±1.45	25	332.5	156.1±14.75	2.13	125.5	1.6
Debris cellular	5.25±0.30	25	131.25	133.05±21.9	0.98	49.5	0.74
Lisado concentrado	**18.92±3.48**	0.5	**9.46**	1.21±0.19	**7.81**	3.57	**5.96**
Lisado filtrado	**7.51±1.94**	5	**37.5**	2.23±0.19	**16.83**	14	**12.8**

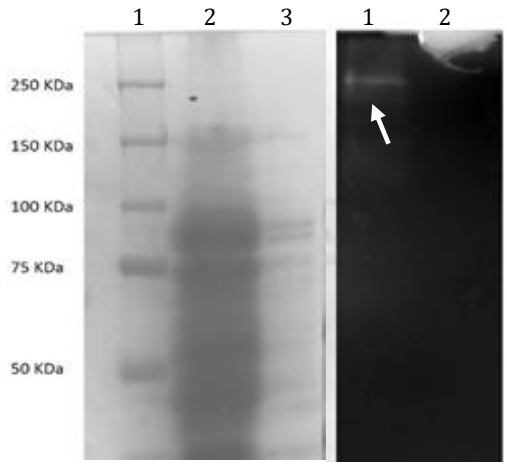

Figura 3. Electroforesis en gel de policarilamida en condiciones desnaturalizante del lisado concentrado de *Sii*-25124 con el dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter. Izquierda: SDS-PAGE, tinción con azul de Commassie Page Blue Protein Stain de Thermo Scientific. Carril 1: marcador de pesos moleculares; carril 2: lisado de *Sii*-25124 concentrado con el dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter; carril 3: muestra del lisado de *Sii*-25124 que se filtró con el dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter. Derecha: zimograma de actividad amilolítica. La flecha indica la banda de actividad amilolítica buscada. Carril 1: lisado de *Sii*-25124 concentrado con el dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter; carril 2: muestra del lisado de *Sii*-25124 que se filtró con el dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter.

Concentración por lisis celular. Se utilizó el mismo ensayo de lisis celular por el método enzimático-mecánico, incrementando volúmenes de cultivo (100, 250 o 500 ml) para llevarlos a un mismo volumen de lisado celular (10 ml); de esta forma, se tendrían lisados concentrados 10, 25 o 100 veces. La tabla 6 muestra el resultado de los enriquecimientos obtenidos, notándose que la mejor forma de concentrar la actividad amilolítica fue a partir del lisado concentrado 25 veces, pues se obtuvo un enriquecimiento de 3.75, lo que contrasta con el enriquecimiento a 10 veces con 2.69 y a 50 veces con 0.53 veces. Kubicek *et al.* (2014) reportaron que la fragmentación o la agregación de proteínas está en función del tiempo de manipulación y del pH del medio, y éstos afectan aún más al escalar protocolos de purificación, un protocolo que sirve para 2 g de pellet celular, puede no ser funcional para 50 g. Por otro lado, en el SDS-PAGE se visualizó una tenue banda de alto peso molecular que corresponde con el peso de la banda de actividad amilolítica del zimograma (figura 4). También en el zimograma se detectó una banda de actividad amilolítica débil en zona de bajo peso molecular (30-50 KDa) que puede corresponder a la actividad amilolítica encontrada en la fracción filtrada durante el uso del dispositivo Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter.

Con los resultados obtenidos será posible usar la concentración por lisis celular a 25 veces, para realizar otras determinaciones, como la secuenciación de las bandas de proteínas, así como la aplicación de un método de purificación como la unión a almidón insoluble.

Tabla 6. Enriquecimiento de la actividad amilolítica usando el método enzimático-mecánico para obtener lisados celulares concentrados.

	Actividad (U/ml)	Vol Fracción (ml)	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U7mg)	%Rendimiento	Enriquecimiento
10x							
Células	9.38±0.56	10	93.8	128±41.6	0.732	100	1
Protoplastos	8.71±0.41	10	87.1	52±4.42	1.67	92.8	2.28
Lisado	8.90±0.11	10	89	45±8.67	1.97	94.6	2.69
Restos	1.04±1.11	10	10.4	16±1.5	0.65	11	0.88
25x							
Células	6.86±0.56	10	68.6	342±33.4	0.200	100	1
Protoplastos	8.73±1.51	10	87.3	391±31.7	0.222	127	1.11
Lisado	**12.48±0.75**	**10**	**124.8**	**166±20.6**	**0.751**	**181**	**3.753**
Restos	0.425±0.19	10	4.25	73±3.53	0.057	6.19	0.285
50x							
Células	11.46±1.07	10	114.6	310±29.1	0.369	100	1
Protoplastos	10.73±0.59	10	107.3	291±21.5	0.368	93.6	0.99
Lisado	3.48±0.89	10	34.8	175±19.06	0.198	30.3	0.53
Restos	6.06±0.67	10	60.6	61±5.47	0.993	52.8	2.89

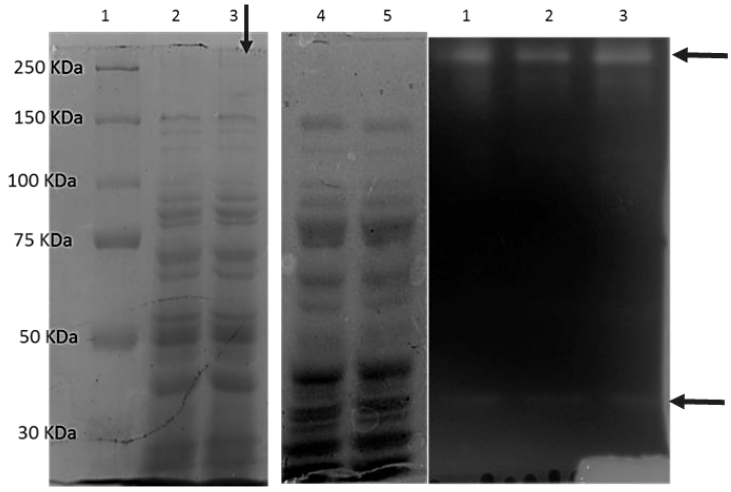

Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de los lisados celulares de *Sii*-25124 concentrados 10, 25 y 100 veces. Izquierda: geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie Page Blue Protein Stain de Thermo Scientific de los lisados celulares de *Sii*-25124. Carril 1: marcador de pesos moleculares; carril 2: lisado concentrado 10 veces; carril 3: lisado concentrado 25 veces; carril 4 y 5 (duplicado): lisado concentrado 50 veces. Derecha: zimograma de los lisados celulares de *Sii*-25124. Carril 1: lisado concentrado 10 veces; carril 2: lisado concentrado 25 veces; carril 3: lisado concentrado 50 veces. Las flechas indican las bandas de actividad amilolítica: una intensa en la zona de 250 KDa y otra más tenue entre 50 y 30 KDa. También se indica la banda de proteína en el SDS-PAGE que se tiñó de forma muy tenue.

CONCLUSIONES

Se logró liberar la actividad amilolítica de Sii-25124 con el buffer TE 1x, obteniéndose protoplastos con 87% de la actividad inicial y posteriormente, un lisado celular con el 94% de actividad. Asimismo, por medio del método enzimático-mecánico el lisado celular de Sii-25124 se concentró hasta 25 veces, que fue suficiente para observar en los geles SDS-PAGE dos amilasas, una de alto y otra de bajo peso molecular, mismas que se relacionaron con bandas activas en el zimograma.

Estos resultados permitirán la continuidad del estudio de la actividad amilolítica de *Sii*-25124 enfocados en dos enzimas amilasas, para lo cual la purificación y caracterización de ambas es de gran interés.

REFERENCIAS

Ampe F, Ben Omar N, Moizan C, Wacher C & Guyot JP (1999) Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-Independent methods to investigate traditional

fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5464–5473.

Blandino A, Al-Aseeri ME, Pandiella SS, Cantero D & Webb C (2003) Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int*. 36:527-543.

Bhuyan AK (2009) On the mechanism of SDS-induced protein denaturation. *Biopolymers*, 93:186-199.

Brenner S, Dark FA, Gerhardt P, Jeynes MH, Kandler O, Kellenberger E, Klienberger-Nobel E, McQuillen K, Rubio-Huertos M, Salton MRJ, Strange RE, Tomcsik J & Weibul C (1958) Bacteria protoplasts. *Nature*. 181:1713-1715.

Cazenave C & Toulmé JJ (2001) Gel renaturation assay for ribonucleases. In: Methods in Enzymology. Vol. 341 Academic Press. pp. 113-117.

Díaz Ruiz G (2003) Fermentación del Almidón por Bacterias Lácticas Amilolíticas Aisladas del Pozol. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.

Díaz-Ruiz G, Guyot J P, Ruiz-Terán F, Morlon-Guyot J & Wacher C (2003) Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a mexican fermented maize beverage. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4367-4374.

Dyballa N & Metzger N (2009) Fast and sensitive coloidal Coomassie G-250 staining for proteins in polyacruylamide gels. *JoVE* 30.

Freer SN (1993) Purification and characterization of the extracellular α-amylase from *Streptococcus bovis* JB1. *Appl. Environ. Microbiol*. 59:1398-1402.

García-Cano I, Velasco-Pérez L, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S, Mendoza-Hernández G, Llorente-Bousquets A & Farrés A (2011) Detection, cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *J. Appl. Microbiol*. 111:607-615.

Giraud E, Brauman A, Keleke S, Lelong B & Raimbault M (1991) Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus platarum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:379-383.

Giraud E, Gosselin L, Marin B, Parada JL & Raimbault M (1993) Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6. *J. Appl. Bacteriol*. 75:276-282.

Grabski AC (2009) Preparation of extracts and subcellular fractionation. *In:* Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification. Burgess R Richard & Murray P (ed) Deutscher. Elsevier. EUA. pp. 287-289.

Hu X & Beeton C (2010) Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. *JoVE*. 45.

Kubicek J, Block H, Maertens B, Spriesterbach A & Labahn J (2014) Expression and purification of membrane proteins. *In:* Methods in Enzymology. Vol. 54. Elsevier Inc. pp. 118-120.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lee YC & Yang D (2002) Determination of lysozyme activities in microplat format. *Anal. Chem*. 310:223-224.

Lederber J (1956) Bacterial protoplasts induced by penicillin. *Biochemistry*. 42:574-577.

Martin A, Martínez F, Calvo JI, Prádanos P, Palacio L & Hernández A (2002) Protein adsorption onto an inorganic microfiltration membrane: Solute-solid interactions and Surface coverage. *J. Membr. Sci*. 207:199-202

Michaux C, Pomroy MC & Privé GG (2008) Refolding SDS-denatured proteins by the addition of amphipathic cosolvents. *J. Mol. Biol*. 35:1477-1488.

Nakamura LK (1981) *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *Int. J. Sys. Bacteriol*. 31:56-63.

Pesarrodona M, Unzueta U & Vázquez E (2015) Dialysis: A characterization method of aggregation tendency. *In*: Insoluble Proteins: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. García-Fruitós E (ed) Springer Science+Business Media, NY pp. 321-322.

Petrova P, Petrov K & Stoyancheva G (2013) Starch-modifying enzymes of lactic acid bacteria – structures, properties and applications. *Starch*. 65:34-47.

Quintero M, Montoya OI & Gutiérrez PA (2009) Purificación y caracterización de una α-amilasa producida por la cepa nativa *Bacillus* sp. BBM1*. Dyna*. 162:31-38.

Rezaei H, Ashtiani FZ & Fouladitajar A (2013) Fouling behavior and performance of microfiltration membranes for whey treatment in steady and unsteady.state conditions*. Braz. J. Chem. Eng*. 31:503-518.

Satoh E, Nimura Y, Uchimura T, Kozaki M & Komagata K (1993) Molecular cloning and expression of two α-amylase genes from *Streptococcus bovis* 148 in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3669-3673.

Satoh E, Uchimura T, Kudo T & Komagata K (1997) Purification, characterization and nucleotide sequence of an intracellular maltotriose-producing α-amylase from *Streptococcus bovis* 148. *Appl. Environ. Microbiol*. 63:4941-4944.

Stathopulos PB, Scholz GA, Hwang YM, Rumfeldt JAO, Lepock JR & Meiering E (2004) Sonication of preteins causes formation of aggregates that resemble amyloid. *Protein Sci*. 13:3017-3027.

Sun H, Zhao P, Ge X, Xia Y, Hao Z, Liu J & Peng M (2009) Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. *Appl, Biochem. Biotechnol.*160:988-1003.

Virgilio T (2005) Purificación de la amilasa de una bacteria del género *Streptococcus* aislada del pozol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.

Vishnu C, Nveena BJ, Altaf M, Venkateshwar M & Reddy G (2006) Amylopullulanase – A novel enzyme of *L. amylophilus* GV6 in direct fermentation of starch to L(+) lactic acid. *Enzyme Micro. Technol.* 38:545-550.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto PAPIIT/UNAM IN223917. Carolina Rodríguez-Saavedra agradece a CONACyT la beca otorgada para sus estudios de posgrado (590108).



www.smbb.com.mx