

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Bioprospección de Microorganismos Hidrolíticamente
Activos Aislados de Suelos de Ambiente de Ganado Vacuno
de los Municipios de Ures y Hermosillo, Sonora**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Jesus Arturo Zamora Erazo

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

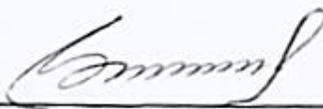
Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Jesus Arturo Zamora Erazo la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.



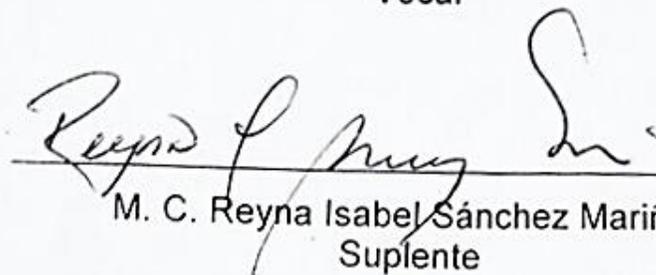
Dra. Itzamná Baqueiro Peña
Presidente del jurado



M. C. Lucía Guadalupe Castellón Campaña
Secretario



M. C. Griselda Macrina Moreno Ibarra
Vocal



M. C. Reyna Isabel Sánchez Mariñez
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Dagoberto Zamora y Mireya Erazo, por el apoyo incondicional que me han brindado durante el trayecto de mi vida. Por el esfuerzo que hacen todos los días para brindarme un mejor futuro y por todos los consejos invaluable que me sirvieron para salir adelante ante la adversidad. Gracias por todo eso, y mucho más. El más pequeño de sus retoños está creciendo ¡Los amo papitos!

A mis hermanos, Dagoberto Zamora y Sergio Zamora, por todo el amor, cariño y apoyo incondicional que me han dado. Gracias por sus enseñanzas y la paciencia que me han tenido durante muchos años.

Gracias Bruno, por acompañarme durante el transcurso de mi licenciatura. Gracias por estar conmigo en los momentos de alegría, como también, en los de enfermedad. Muchas gracias por tu apoyo, consejos, paciencia y comprensión. Gracias por alentarme para siempre seguir adelante y no dejarme caer ante la presión. De aquí hasta el conejo celeste.

A mi directora de tesis, Dra. Itzamná Baqueiro Peña, por todas las lecciones diarias que me impartió, la paciencia y el voto de confianza me brindó al inicio de la tesis. Gracias por el conocimiento y tiempo valioso que me dedicó para la realización de este trabajo.

A mis sinodales, M.C. Lucía Guadalupe Castellón Campaña, M.C. Griselda Macrina Moreno Ibarra y M.C. Reyna Isabel Sánchez Maríñez, gracias por tomarse el tiempo de revisar esta tesis, por sus acertadas observaciones y sugerencias a la misma.

A mis amigos, Ana Sortillón, Nacxit Delgado, Alejandra Camargo y en especial a Stephany Najera Magaña, Michelle Fierro Borbón, Mara Salazar Martínez y Flor María Soto Acosta, por estar conmigo en los momentos de gloria o desesperación, por todo el apoyo incondicional. Es un honor conocerlos, haber compartido aulas y laboratorios, pero sobre todo, haber compartido tiempo juntos.

Por último, doy gracias a la Universidad de Sonora, a mis maestros por formarme tanto en lo académico como en lo personal. Gracias al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo por haberme apoyado en la realización de esta tesis como becario. Gracias Dr. Ali Asaff Torres por aceptarme en el Laboratorio de Biotecnología Industrial, así como también, doy gracias a mis compañeros de laboratorio por todo el apoyo que se me brindó.

CONTENIDO

RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	9
OBJETIVO.....	10
OBJETIVOS PARTICULARES.....	10
REVISIÓN DE LITERATURA	11
Regiones Ganaderas de la República Mexicana.....	11
Producción de Ganado Bovino en México y en el Estado de Sonora.....	11
Bioprospección.....	12
Bioprospección Microbiana	12
Bacterias Esporulantes	12
Género Bacillus	13
Filo Actinobacteria.....	13
Generalidades de las Enzimas.....	14
Clasificación de Enzimas.....	14
Amilasa	15
Almidón.....	16
Lipasa.....	17
Proteasa.....	19
Producción de Enzimas de Interés por <i>Bacillus</i> y Actinomicetos.....	20
Utilización de Microorganismos en Efluentes Industriales	21
METODOLOGÍA.....	22
Selección de Zonas de Muestreo.....	22
Tratamiento de Muestras.....	24
Tamizaje Hidrolítico	25
Capacidad Hidrolítica	25
Esporulación	26
Morfología	26
Tinción Gram	27
Tamizaje Hidrolítico de Bacterias con Capacidades Esporulantes a Diferentes Valores de pH.....	27

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
Tamizaje Hidrolítico	29
Selección de Cepas Hidrolíticas	29
Eliminación de Cepas Fúngicas	29
Cepas Esporulantes	29
Morfología y Tinción Gram	31
Tamizaje Hidrolítico de Bacterias Esporulantes a Diferentes pH	33
CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	48

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Puntos de recolección de muestras en Ures, Sonora.	21
2.	Puntos de recolección de muestras en Hermosillo, Sonora.	22
3.	Puntos de donde se aislaron las cepas de Ures, Sonora.	29
4.	Puntos de los aislamientos de las cepas de Hermosillo, Sonora.	29
5.	Morfología macroscópica de las cepas con capacidad hidrolítica.	31
6.	Morfología macroscópica del margen de las cepas con capacidad hidrolítica.	31
7.	Tinción Gram de las cepas con capacidad hidrolítica.	31
8.	Capacidad proteolítica de las cepas aisladas de Ures.	34
9.	Capacidad proteolítica de las cepas aisladas de Hermosillo.	34
10.	Capacidad amilolítica de las cepas aisladas de Ures.	37
11.	Capacidad amilolítica de las cepas aisladas de Hermosillo.	39
12.	Capacidad lipolítica de las cepas aisladas de Ures.	42
13.	Capacidad lipolítica de las cepas aisladas de Hermosillo.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Resumen de la conformación de una enzima.	13
2.	Acción de la enzima amilasa en almidón.	16
3.	Acción de hidrólisis catalizada por la enzima lipasa	17
4.	Acción catalítica de endopeptidasas	18
5.	Establo perteneciente a Ures, Sonora	22
6.	Rancho perteneciente a Hermosillo, Sonora	22
7.	Morfología Macroscópica colonial	26
8.	Tinción de esporas	30
9.	Tinción Gram cepa PR-22	32
10.	Tinción Gram cepa 1AB2-P	32
11.	Tamizaje proteolítico de las cepas aisladas de Ures y Hermosillo	33
12.	Tamizaje amilolítico de las cepas aisladas de Ures y Hermosillo	37
13.	Tamizaje lipolítico con tributirina de las cepas aisladas de Ures y Hermosillo	40
14.	Tamizaje lipolítico con trioctanoína de las cepas aisladas de Ures y Hermosillo	41

RESUMEN

El interés industrial en los microorganismos ha aumentado gracias a que han sido considerados como poderosos biotransformadores. Por ello, las bioprospecciones microbianas son muy útiles en la búsqueda de microorganismos de un ambiente en específico con la finalidad de conferirles un valor comercial para el desarrollo de productos.

Los ambientes agrícolas seleccionados para este estudio fueron los municipios de Ures por ser considerado uno de los mayores productores de queso, y Hermosillo por ser el mayor productor de carne de origen bovino en el estado, aislándose de ellos un total de 144 cepas (62 y 82 respectivamente).

El total de las cepas aisladas (144) fueron evaluadas en su capacidad esporulante, para posteriormente en las cepas seleccionadas poder medir su actividad proteolítica, amilolítica y lipolítica.

Del total de cepas aisladas solo 32 procedieron del municipio de Ures y 7 de Hermosillo presentaron capacidad esporulante. Estas cepas presentaron las siguientes características morfológicas: 18 de ellas fueron puntiformes, 24 presentaron elevación plana y 21 de ellas fueron translúcidas. Además 31 de las cepas fueron Gram positivas.

En base al criterio de selección por su actividad proteolítica, amilolítica y lipolítica, se logró aislar 49 cepas de los municipios de Ures y Hermosillo, en donde el 14% de ellas presentan actividad amilolítica, solo el 2% presenta actividad proteolítica, de igual manera el 2% presenta actividad amilolítica y proteolítica. El 2% presenta actividad amilolítica y lipolítica y por último, el 49% de las cepas presentaron actividad amilolítica y proteolítica.

De las 49 cepas aisladas, para la actividad proteolítica, 22 de ellas presentaron las mayores actividades a pH 7 y pH 9; para la actividad amilolítica, 35 cepas presentaron los mayores títulos amilolíticos en los rangos de pH 4, 7 y 9; y por último, solo 3 cepas presentaron actividad media de la enzima lipasa hidrolizando la tributirina a pH de 8.

Por los resultados obtenidos, se ha visto que en ambientes agrícolas donde hay ganado bovino se es posible el aislamiento de bacterias que cuentan con actividades enzimáticas de interés que pueden ser utilizados para procesos industriales.

INTRODUCCIÓN

La bioprospección microbiana da referencia a la búsqueda de microorganismos con la finalidad de conferirles un valor comercial. Hoy en día ha sido utilizada para la búsqueda de metabolitos y enzimas. Se ha enfatizado la bioprospección en microorganismos que viven en ambientes extremos (de Almeida y col., 2015; Torres y col., 2009)

El estado de sonora puede alcanzar temperaturas de hasta 45°C en verano, y por ser zona desértica, se puede ver severamente afectada por la desertificación, término utilizado para conocer la degradación de suelo en zonas áridas, La erosión del suelo para uso ganadero es el más común, debido al sobrepastoreo en los establos y concentraciones altas de sales en aguas que son utilizadas (López, 2001).

De suelos agrícolas áridos se pueden encontrar bacterias esporulantes, las cuales son capaces de resistir periodos a temperaturas altas con una baja disponibilidad de nutrientes. La formación de esporas es un mecanismo de supervivencia, que permite a la bacteria entrar en un estado de reposo metabólico. La formación de la espora interna (endoespora) se da cuando la bacteria se encuentra bajo ciertas condiciones como altas temperaturas, altas concentraciones de sales o pH dentro de altos rangos ácidos o alcalinos. Bajo esas condiciones, la bacteria realiza en su interior una deshidratación, por lo tanto, el material dentro de ella se concentra, y a su alrededor, se forman capas que dan a la espora la característica de ser gruesa y resistencia térmica, así como a radiación, desecación o a químicos, entre otras resistencias (García, 2005; Kanchiswamy y col., 2015).

Solamente pocos géneros de bacterias son capaces de esporular. Los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Actinomyces*, entre otros, son conocidos por su uso en la industria para la obtención de enzimas que son utilizadas en la industria como amilasas, lipasas y proteasas. Como ejemplo de los usos en la industria, las amilasas son utilizadas para la producción de jarabes de glucosa o fructosa o como suplemento de enzimas pancreáticas. Las lipasas pueden servir para la elaboración de quesos así como también para modificar propiedades físicas y químicas en ácidos grasos. Por último, las proteasas, son utilizadas para mejorar la estabilidad en las masas de panes, son incluidas en detergentes y sirven como suplemento enzimático (Amman y col. 2011; Rivera y García., 2007; Romero y Mestres, 2004; Theron y Divol, 2012).

OBJETIVO

Aislamiento de cepas de microorganismos hidrolíticamente activos provenientes de ambiente de ganado vacuno en los municipios de Ures y Hermosillo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar cepas de bacterias provenientes de los municipios de Ures y Hermosillo que presenten capacidad esporulante.
- Realizar tamizaje enzimático de cepas esporulantes para conocer sus actividades amilolíticas, proteolíticas y lipolíticas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Regiones Ganaderas de la República Mexicana

En México hay alrededor de 197 millones de hectáreas con diferentes regiones ecológicas que le brindan la principal característica a su ganadería. Del total de la extensión del territorio nacional, aproximadamente el 25% es árido, el 20% semiárido, el 23% es templado, el 15% es trópico seco y el 12% trópico húmedo. La ganadería constituye el principal uso del suelo del país, abarcando una superficie de 113.8 millones de hectáreas utilizadas para este rubro, representando el 58% del territorio nacional (INEGI, 2014).

Producción de Ganado Bovino en México y en el Estado de Sonora.

En la actualidad México se desarrolla en condiciones muy heterogéneas tanto desde el punto de vista tecnológico y socio económico, como por la variabilidad de condiciones climatológicas, que éstas adquieren características propias por región en los diferentes estados del país, influyendo tradiciones y costumbres de la población. Por lo tanto, los sistemas lucrativos del ganado bovino van desde la producción más básica, hasta aquella que sirve para la subsistencia de una misma región.

La crianza de ganado bovino tiene dos principales funciones, las cuales son la obtención de kilogramos de carne y producción de leche. En el año 2014 Sonora se colocó en el octavo puesto en la producción de ganado bovino con un total de 131 872 toneladas, considerándolo uno de los estados con mayor producción de la República Mexicana (SAGARPA, 2014).

Dentro del estado de Sonora, los municipios que más se destacan por el volumen de producción de carne de origen bovino son Navojoa, Caborca, Agua Prieta, Ciudad Obregón y Hermosillo siendo este último el mayor productor con un total de 21 259 toneladas en el año del 2012. De la producción de leche, los municipios destacados son Ciudad Obregón, Hermosillo, Empalme y Ures considerando al último municipio mencionado como uno de los grandes productores de queso en Sonora (INEGI, 2012).

Bioprospección

Se define a la bioprospección como la búsqueda sistemática de componentes naturales y organismos en un ecosistema con la finalidad de conferirles un valor comercial para el desarrollo de productos. Con ayuda de la bioprospección se generan productos relacionados con industrias farmacéuticas, biotecnológicas, medicina botánica; entre otras (Torres y col., 2009).

Bioprospección Microbiana

La bioprospección microbiana es esencial hoy en día debido a que ha sido utilizada como una herramienta para la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas provenientes de diferentes ambientes u organismos específicos. Los microorganismos son esenciales en la bioprospección, debido a la producción de metabolitos secundarios y de catalizadores (Carrizosa y col., 2000).

En la búsqueda de enzimas, se han enfatizado los trabajos de bioprospección de los microorganismos que viven en condiciones extremas, y que por esto, hayan podido evolucionar y modificar las enzimas confiriéndoles propiedades adecuadas para lograr subsistir en los ambientes extremos (de Almeida y col., 2015).

Un ejemplo de ambiente extremo serían los ecosistemas agrícolas, en donde hay regiones de suelo que se encuentran directamente influidas por plantas, animales y compuestos orgánicos en descomposición los cuales pueden estar asociados a microbiotas que puede ser encontrada en el suelo, como ejemplo, bacterias esporulantes capaces de resistir periodos a temperaturas altas, baja disponibilidad de nutrientes, etc (Kanchiswamy y col., 2015).

Bacterias Esporulantes

El interés en las bacterias formadoras de endoesporas ha aumentado en los últimos años gracias a su potencial biotecnológico tanto como para la degradación de contaminantes y producción industrial de importantes enzimas y químicos bioactivos (de Almeida y col., 2015).

La formación de esporas es un mecanismo de supervivencia que tienen los microorganismos cuando son expuestos en un ambiente o condiciones no favorables, llegando a un estado de crecimiento inactivo o en reposo (Abel-Santos, 2012). Se ha identificado a un variado número de bacterias formadoras de endoesporas que se encuentran en diferentes hábitats como el suelo.

Dentro del grupo de bacterias esporulantes se pueden mencionar géneros de bacterias aerobias heterótrofas como *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Thermoactinomyces* y *Sporolactobacillus*. También pueden ser mencionadas bacterias anaerobias como *Clostridium*, *Anaerobacter* y *Desulfotomaculum*; y bacterias halófilas como *Sporohalobacter*, entre otros géneros de bacterias (Ammann y col., 2011). Por su capacidad esporulante y características para producir catalizadores utilizados en procesos de la industria, se consideran de mayor interés bacterias del género *Bacillus* o actinomicetos.

Género Bacillus

Formado por un gran grupo de bacilos Gram positivos, catalasa positivo, facultativos que tienen como característica la capacidad de formar esporas en condiciones aerobias. Se les puede encontrar con frecuencia en el suelo y pocos subgéneros son patógenos para el ser humano como *B. anthracis* o *B. cereus*.

Como criterios para la taxonomía se utiliza la formación de endoesporas, la localización que ésta tenga y los cambios en la pared celular de las bacterias gracias a la formación de endoesporas (Tortora y col., 2013; Winn y Koneman, 2008).

Filo Actinobacteria

Dentro de este filo pertenecen cierto grupo de géneros como *Streptomyces*, *Frankia*, *Actinomyces* y *Nocardia* a los cuales se les denomina de manera informal como “actinomicetos” debido al crecimiento radiado que tienen las colonias en forma de estrella gracias a sus filamentos ramificados. Su morfología se parece a la de los hongos filamentosos, pero los filamentos de los actinomicetos son células procariontes con un diámetro de menor tamaño que el de los hongos filamentosos eucariontes.

Se pueden encontrar en el suelo usualmente, y gracias a su posibilidad de tener esporas asexuales externas, pueden evitar largos periodos sin agua. Este tipo de morfología le da al actinomiceto la posibilidad de tener un mayor volumen y mejorar su capacidad de absorber nutrientes en el ambiente del suelo que es altamente competitivo (Tortora y col., 2013).

Generalidades de las Enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos que incrementan la velocidad de las reacciones químicas dentro de células vivas sin que ellas sufran algún cambio. La sustancia que reacciona con la enzima para ser catalizada se le denomina sustrato y cada enzima es específica que actúa en uno o varios sustratos para obtener uno o más productos en particular (Garrett y Grisham, 2013).

Algunas de las enzimas si no cuentan con la presencia de un componente no proteico al cual se le denomina cofactor, carecen de actividad catalítica. Cuando este caso sucede se le denomina apoenzima al componente proteico inactivo de una enzima, pero si incluye el cofactor, se le denomina holoenzima siendo ella una enzima funcional. El cofactor puede ser una molécula orgánica denominándose coenzima, pero también puede ser un ion metálico como lo muestra el resumen de la Figura 1 (Palmer y Bonner, 2008).

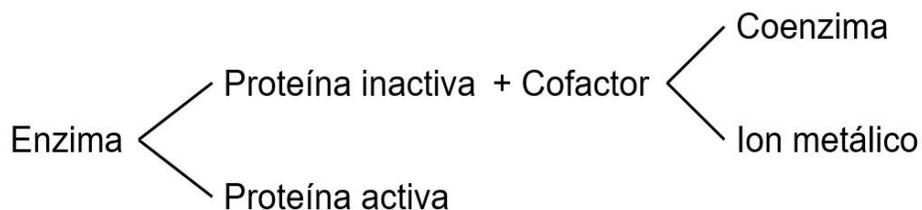


Figura 1. Resumen de la conformación de una enzima en diagrama.
(Palmer y Bonner, 2008).

Clasificación de Enzimas

A varias de las enzimas existentes se les ha añadido el sufijo “asa” después del nombre del sustrato donde la enzima tiene su acción catalítica. El derivado de esta nomenclatura es que muchas enzimas no dan la información necesaria para conocer donde actúa químicamente.

Varios sistemas para la clasificación enzimática han sido propuestos. Se podría clasificar en forma general a las enzimas dependiendo del sustrato donde actúen, sin embargo, las que

están presentes en los alimentos o aquellas que son utilizadas con fines tecnológicos pertenecen a la clase de las oxidoreductasas tales como la peroxidasa o catalasa y las hidrolasa (Melendez, 2004).

En la década de 1960, la Unión Internacional de Bioquímica (IUB) creó una Comisión sobre Nomenclatura de las Enzimas para poder tener y adoptar una clasificación sistemática, así como, una nomenclatura para las enzimas identificadas dependiendo del tipo de reacción catalítica que realicen.

De acuerdo la comisión de enzimas, la clasificación sistemática va indicando un número para el grupo, teniendo los siguientes grupos:

1. Oxidoreductasas: enzimas que participan en reacciones de oxidación-reducción.
2. Transferasas: catalizan la transferencia de grupos funcionales.
3. Hidrolasas: su acción se lleva a cabo en reacciones de hidrólisis.
4. Liasas: enzimas que participan en la ruptura de enlaces en donde son diferentes al proceso de hidrólisis o de oxidación.
5. Isomerasas: tienen acción en reacciones de isomerización.
6. Ligasas: participan en la formación de enlaces con la utilización de ATP (Garrett y Grisham, 2013).

En la nomenclatura, el primer dígito indica a cual grupo pertenece, seguido de un segundo número correspondiente a la subclase de la enzima indicando al tipo de enlace que hidroliza. Un tercer dígito indica la subdivisión dando a conocer más información en relación al sustrato que utiliza, y por último, el cuarto dígito muestra específicamente la acción que tiene la enzima (Melendez, 2004).

Amilasa

En el área industrial forma parte de algunos procesos para la producción de alimentos, farmacéutica, detergentes, textiles, entre otros. Se encuentran en el tercer grupo de la clasificación de enzimas dado por Comisión sobre Nomenclatura de las Enzimas (Natalia y col., 2015).

Las α -amilasas utilizadas en la industria tienen actividad en un rango de pH 6.5 y con temperatura de hasta los 95°C requiriendo al ión Ca^{2+} que le ayuda en la estabilidad así como también en su actividad (Sharma y Satyanarayana, 2013). La enzima de la α -amilasa es de suma importancia digestiva ya que se encuentra extensamente en la naturaleza. Puede ser encontrado en microorganismos tales como bacterias y hongos, así como también en plantas y

animales hidrolizando enlaces glucosídicos $\alpha(1-4)$ encontrados en polisacáridos (Brayer y col., 1995).

En las β -amilasas la mayoría de ellas son termolábiles ya que pierden su actividad a temperaturas altas, aunque han sido reportadas β -amilasas termoactivas que fueron purificadas a partir de *Clostridium thermosulfurogenes* (Derde y col., 2012). Según la evidencia encontrada, es una proteína simple la cual no necesita de algún cofactor, ion metálico o grupos activos que no formen parte de la proteína (Srivastava y col., 2014).

Almidón

El compuesto que sirve como principal producto de almacenamiento en semillas y otros órganos es el almidón, siendo un polímero de moléculas de glucosa. En el mundo, se dice que representa un 80% de la ingesta diaria siendo utilizado como alimento animal, así también, como materia prima en la industria (Martínez y Bernal, 2005).

El almidón es depositado por las células vegetales en el citoplasma en forma de granulomas insolubles, los cuales están compuestos por α -amilosa y amilopectina. Al polímero lineal que contiene miles de residuos glucosa que se encuentran unidos por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ se le denomina α -amilosa. La amilopectina tiene en mayor cantidad terminaciones de glucosa con enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$, sin embargo, es un polisacárido que presenta puntos de ramificación $\alpha(1\rightarrow6)$ cada 24 a 30 residuos de glucosa aproximadamente (Voet y col., 2007).

Degradación del almidón por acción de la amilasa. La hidrolización del almidón a glucosa, maltosa y oligosacáridos derivados de la maltosa (como dextrinas), son realizados por la α y β -amilasa así como también de otras enzimas relacionadas (Cockburn y col., 2015).

Mecanismo de acción de la amilasa. En la figura 2 se muestra como la α -amilasa de forma aleatoria hidroliza los enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$, mediante la transferencia de un resto glucósido (donador) a H_2O (receptor). De la hidrólisis habrá producción de maltosa y en gran mayoría dextrinas que en ellas actuará la β -amilasa hidrolizando enlaces glucosídicos terminales $(1\rightarrow4)$ liberando a la maltosa siendo ella utilizada posteriormente (Voet y col., 2007).

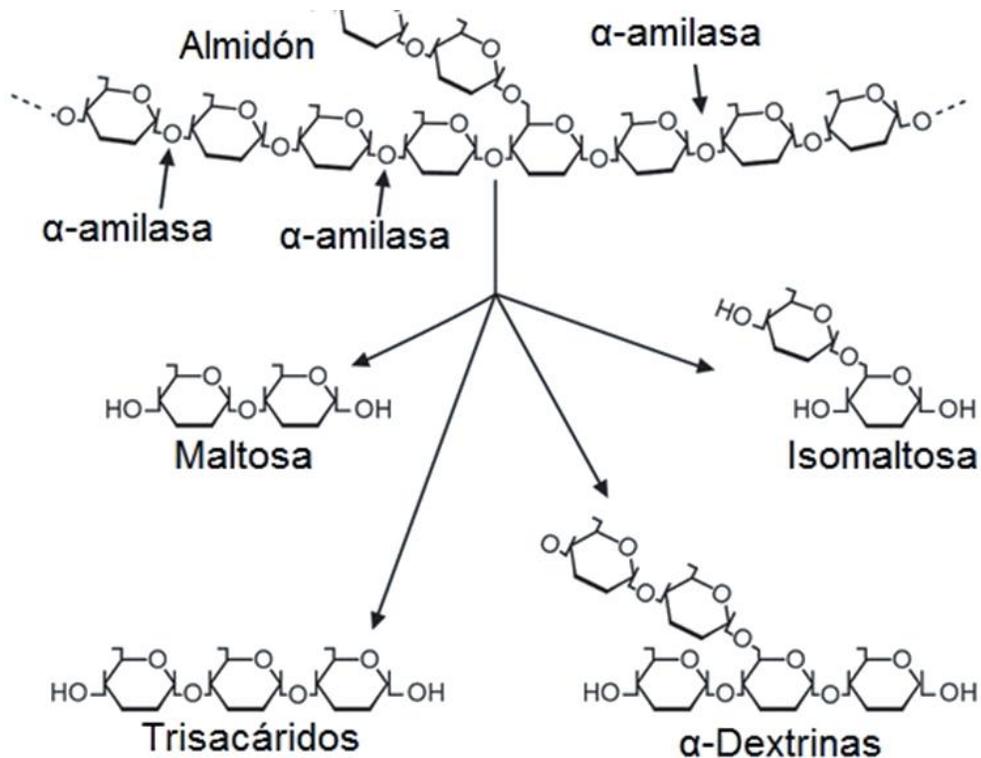


Figura 2. Acción de la enzima amilasa en almidón.
(Lieberman, y col., 2013).

Lipasa

En aplicaciones biotecnológicas hay dos catalizadores que son los más importantes, siendo estos, las enzimas de lipasa (triacilglicerol acilhidrolasa; EC 3.1.1.3) y esterasa (carboxil-ester hidrolasa; EC 3.1.1.1). La lipasa se distingue por la capacidad que tienen de poder hidrolizar aquellos triglicéridos de larga cadena no solubles, teniendo aplicaciones en la modificación biológica de moléculas activas, resaltando el sabor o las propiedades nutricionales en comidas (Mateos y col., 2012).

Las lipasas han sido encontradas en animales, plantas, hongos así como en bacterias, siendo éstas últimas de gran importancia como potencial industrial. Desde 1901 se observaba que existía la presencia de lipasa en bacterias como *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. La lipasa producida por microorganismos tiene mayor estabilidad, así como también, mayor disponibilidad en comparación de las lipasas producidas

por plantas o animales. Formada de manera extracelular por hongos o bacterias (Aravindan y col., 2006).

Esta enzima puede realizar diferentes reacciones tales como hidrólisis, síntesis de ésteres, transesterificación, interesterificación y acidólisis, pero de forma nativa cataliza la reacción de hidrólisis en triglicéridos. Durante el proceso varios de los productos obtenidos son: ácidos grasos libres y glicerol como se muestra en la Figura 3; la hidrólisis tiene un proceso reversible, el cual se le denomina esterificación.

Hay un equilibrio entre hidrolizar y esterificar y es mediado por el agua que se encuentra disponible en la mezcla. Si en una reacción hay un ambiente en donde la cantidad de agua se encuentra baja o no hay presencia de ella, la enzima actúa de manera eficiente para catalizar la formación de enlaces éster entre el ácido graso y el alcohol del glicerol. De manera contraria, si en el sistema donde se lleva a cabo la reacción hay presencia de agua, la enzima actuará rompiendo los enlaces éster liberando a los ácidos grasos libres y al glicerol (Abu y col., 2006).

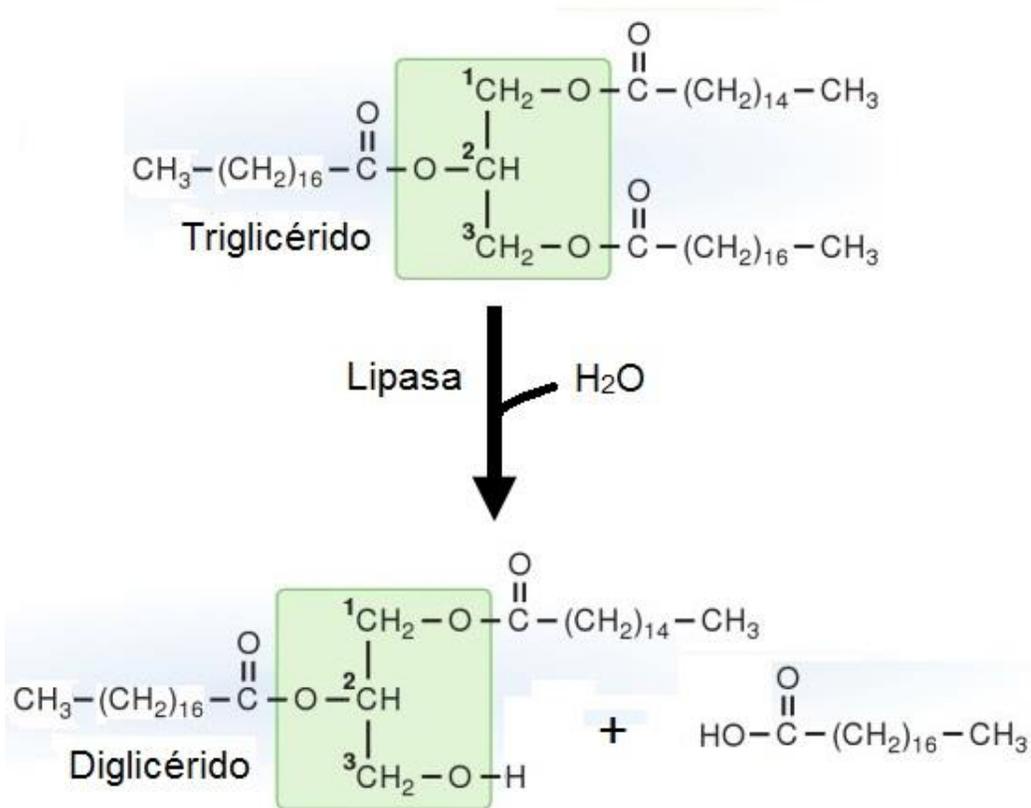


Figura 3. Acción de hidrólisis catalizada por la enzima lipasa. (Lieberman y col., 2013).

Proteasa

De igual manera, las proteasas son enzimas de gran importancia biológica aunque también tienen una gran variedad de usos y aplicaciones en la industria como las productoras de alimentos y medicamentos, industria médica y de detergentes, etc. Se puede encontrar una excelente fuente de producción de proteasas alcalinas en microorganismos, ya que, muestran mejores ventajas en la diversidad bioquímica y simplicidad en la manipulación genética (Theron y Divol, 2014).

Industrialmente las proteasas (EC 3.4) son muy útiles para la hidrólisis de los enlaces peptídicos que existen en las terminaciones de aminoácidos; sobresaliendo en el mercado mundial enzimático.

Se puede clasificar a las proteasas en base a su pH, dando tres tipos los cuales serían las proteasas que actúan en pH ácido, aquellas que funcionan en pH neutro y las que tienen acción en pH alcalino. Sin embargo, los grandes grupos en los que se clasifican comúnmente son: proteinasas (endopeptidasas) y peptidasas (exopeptidasas). Las primeras actúan sobre enlaces peptídicos que se encuentran en las extremos de las cadenas, lo cual da la opción de ser aminopeptidasas o carboxipeptidasas como se muestra en la Figura 4. Las proteinasas actúan en el interior de la cadena clasificándose de acuerdo al residuo catalítico primario donde actúan (Chávez, 2007).

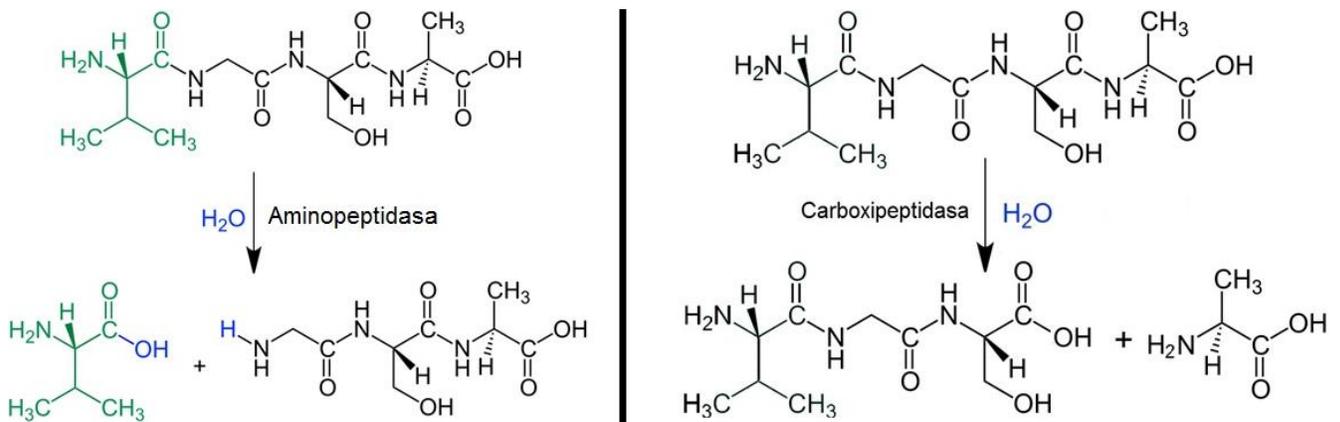


Figura 4. Acción catalítica de endopeptidasas.

Devlin, (2004)

La hidrólisis enzimática de proteínas ha atraído la atención durante la última década (Anbu, 2013; Lin y col., 2015). Su aplicación puede ser encontrada en detergentes, cuero,

alimentos así como también en la industria farmacéutica, constituyendo el 40% del total de enzimas utilizadas en el mercado. El género de *Bacillus* se considera uno de los más importantes productores de enzima extracelular que puede ser encontrada de manera comercial gracias a que cuenta con una gran estabilidad tanto para pH altos, como también, a altas temperaturas (Anbu, 2013).

Producción de Enzimas de Interés por *Bacillus* y Actinomicetos.

Dentro del género *Bacillus* se han conocido varias cepas que son excelentes productoras en su metabolismo de amilasas. *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefacines* y *Bacillus licheniformis* son especialmente una fuente importante de obtención de α -amilasa ya que le brindan a la enzima la propiedad de ser termoestable, convirtiéndose en un recurso de gran importancia por su constante uso en procesos industriales, por ejemplo, en la gelatinización del almidón, en la producción de fármacos así como también en la producción de detergentes.

De igual manera, algunas cepas de *Bacillus* tienen la capacidad de producir β -amilasas, sin embargo son termolábiles a temperaturas altas (Sarıkaya y col., 2000). En algunos casos, la alternativa para la producción de enzimas como la amilasa son bacterias del género *Streptomyces*, ya que se ha considerado como una opción viable para la producción y expresión de proteínas heterólogas (Sevillano y col., 2016).

Las lipasas que se encuentran de manera comercial son obtenidas usualmente de microorganismos debido a la estabilidad y viabilidad de la enzima producida, siendo liberada de manera extracelular. Hay varias cepas de actinomicetos productoras de lipasa, como por ejemplo *Amycolaptopsis mediterranei*, demostrando una producción de la enzima con la característica de la termoestabilidad (Dheeman y col., 2010).

Se han utilizado lipasas producidas por microorganismos termófilos como *Bacillus subtilis*, ya que tiene la capacidad de secretar diferentes lipasas que pueden variar dependiendo de las condiciones de crecimiento y ambiente a la cual fue expuesta la bacteria (Cavalcante y col., 2013).

Entre los distintos productores de la enzima proteasa que trabaja en un pH alcalino, el género *Bacillus* se destaca por la generación de proteasas alcalinas extracelulares. Son de gran utilización en la industria porque las enzimas que se producen en su metabolismos son resistentes a pH altos, como también, cuenta con una gran estabilidad térmica, siendo reconocido *Bacillus licheniformis* por su producción de proteasa alcalina (Chatterjee, 2015).

Recientemente se ha descubierto que la cepa *Nocardioptosis alkaliphila sp* es una gran productora de proteasa alcalina, con un crecimiento óptimo de pH de 9.5 a 10; aunque, ya se tienen

reportadas proteasas alcalinas producidas por actinomicetos como *Nesterenkoni* sp., *Nocardiopsis* sp. TOA-1 (Mehta y col., 2006).

Utilización de Microorganismos en Efluentes Industriales

En las actividades diarias de la industria se generan grandes cantidades de efluentes que contaminan el medio ambiente. Para casos en específicos de suelos, suelen afectar en la fertilidad y también en su uso en el futuro. En el caso del agua, se puede comprometer seriamente el uso de este recurso como fuente de agua para consumo. La remediación de ambientes contaminados mediante el uso de procesos químicos involucra costos altos debido a la especificidad requerida. Por lo tanto un buena alternativa sería el uso de métodos biológicos para la remediación y tratamiento de contaminantes (Vullo, 2003).

En recientes años se han desarrollado tecnologías alternativas para el tratamiento de efluentes conocidas como bioremediación, que se define como el uso deliberado de las propiedades catalíticas de organismos vivos para eliminar contaminantes de ecosistemas. Dentro de las prácticas de bioremediación las más utilizadas son la incorporación de bacterias que degradan efluentes gracias a las enzimas producidas en su metabolismo y la fitoremediación (Abril, 2005), motivo por el que es de importancia encontrar cepas microbianas con la capacidad hidrolítica que puedan ser utilizadas en el área de bioremediación.

METODOLOGÍA

Selección de Zonas de Muestreo

Para la toma de muestra se seleccionaron dos establos, el primero un establo productor de pequeña escala en Ures, ciudad reconocida en el estado de Sonora por la producción de quesos. Para el segundo establo en el municipio de Hermosillo, se le consideró como un productor de gran escala con un aproximado de 600 vacas, con un giro principal de crianza del ganado para la obtención de carne.

En el establo de Ures ubicado en las coordenadas Latitud: 29.38° N, Longitud: 110.45° O, se seleccionaron 7 puntos estratégicos debido a que se tomó la mayor cantidad de área en donde había un contacto más directo con el ganado y su producto al momento llevar a cabo el proceso de ordeña como se muestra en la Figura 4. En la Tabla 1 se muestra las áreas de muestreo seleccionadas del municipio de Ures.

Tabla 1. Nomenclatura utilizada para las distintas áreas de recolección de muestras en Ures, Sonora.

Nomenclatura	Área de Muestreo
1OR	Zona de ordeña, suelo superficial
2OR	Zona de ordeña, suelo de 10cm profundidad
1AB	Zona de riego con balde, suelo superficial
2AB	Zona de riego con balde, suelo 10cm profundidad
1D	Zona de descanso del ganado, suelo superficial
2D	Zona de descanso del ganado, suelo 10cm profundidad
Mixta	Combinación suelo superficial y con suelo de 10cm profundidad



Figura 5. Establo perteneciente a Ures, Sonora.

En el establo de Hermosillo con las coordenadas Latitud: 28.99° N, Longitud: 111.05° O, se colectaron de 19 puntos estratégicos como se muestran en la Tabla 2, debido a que se trató de tomar muestras de todas las áreas posibles donde el ganado entraba en contacto. También se tomó muestras de aquellas zonas que implicaban desechos del propio ganado, así como se muestra en la Figura 6 la zona de alimentos del ganado.



Figura 6. Rancho perteneciente a Hermosillo, Sonora.

Tabla 2. Nomenclatura utilizada para las distintas áreas de recolección de muestras en Hermosillo, Sonora.

Nomenclatura	Área de Muestreo
AA ^a 1	Alimento
AA ^a 2	Fórmula para ganado finalizada
AA ^a 3	Fórmula para engorda del ganado
AA ^a 4	Comedero
AA ^a 5	Maíz procesado
AP ^b 1	Grasa de piel
AP ^b 2	Sal del curtido de piel
AP ^b 2	Lixiviado del cutido de piel
PR ^c	Superficie de residuos provenientes de la empresa
AE ^d 1	Estiércol tomado de suelo de la superficie
AE ^d 2	Estiércol tomado a 20cm de profundidad
AE ^d 3	Potrero 1, ganado en desarrollo
AE ^d 4	Potrero 1, ganado en descanso
AT ^e 1	Zona de engorda fase 1, suelo de 15cm
AT ^e 2	Zona de engorda fase 1, suelo superficial
AT ^e 3	Potrero 1, ganado en desarrollo
AT ^e 4	Suelo de 20cm del bebedero
AT ^e 5	Potrero 1, descanso de ganado

^a Área de alimentos, ^b Área de pieles, ^c Empresa, ^d Área de estiércol, ^e Área de suelos

Tratamiento de Muestras

Se tomaron 5g de las diferentes muestras obtenidas, colocándose en matraces Erlenmeyer de 100mL que contenían 50mL de agua destilada estéril. Los diferentes matraces se colocaron en un agitador por 1 hora a 200 rpm a 27°C. Finalizada la agitación, se tomó con una asada de la solución para inocular las placas Petri utilizadas en el tamizaje hidrolítico.

Tamizaje Hidrolítico

El tamizaje se realizó para conocer y seleccionar a las cepas con capacidad amilolítica, proteolítica y lipolítica. En cajas Petri de 10mL se colocó el medio de cultivo donde se inoculó por estría cruzada las diferentes muestras ya mencionadas en la sección de selección de zonas de muestreo, esto para conocer la hidrólisis de los diferentes sustratos: almidón, leche descremada, tributirina y trioctanoína.

La composición óptima del medio de cultivo para realizar el tamizaje se conformó de peptona al 0.3%, extracto de levadura al 0.3%, agar al 2% y el sustrato a probar al 2%, con 0.25% de ketoconazol para la inhibición de hongos filamentosos (Mateos y col., 2012).

Capacidad Hidrolítica

Para conocer la capacidad hidrolíticas de las cepas se utilizaron reveladores especiales para cada caso en particular. Para evidenciar la hidrólisis del almidón, se utilizó lugol. Las moléculas de yodo reaccionan con la estructura de la amilosa que se encuentran en el almidón, esta unión da como resultado un color azul oscuro. La ausencia de este color indicaría la nula presencia del almidón y por ende, la hidrólisis por parte de la cepa (Muñoz M. A., 2014).

Para la capacidad proteolítica se utilizó la leche descremada como sustrato, en donde se utilizó el azul de bromotimol como revelador, ya que al ser un indicador de pH, cuando el sustrato se hidroliza hay un viraje de pH ligeramente ácido a uno neutro, esto se notará ya que habrá un cambio de color en el medio, debido a que el azul de bromotimol al tener un pH menor a 6.0 es de color amarillo. En el rango de pH 6.0 a 8.0 el medio virará a un color verde, a pH mayor de 8.0 el indicador cambia a un color azul (Alais y Lacasa, 2003).

Para conocer la capacidad hidrolítica de la enzima lipasa en las cepas se usó rojo de fenol como revelador. De igual manera, es un indicador de pH. Si el pH es menor a 6.5 el vire será a un color amarillo, mientras que a pH mayor a 8.0, el vire será a un color rojo. Al hidrolizarse los sustratos tributirina o trioctanoína, habrá producción de 3 moléculas de ácido por cada triglicérido. Para el caso de la tributirina, se forma el ácido butírico, y para la trioctanoína, se forma el ácido caprílico, los cuales modifican el color del medio (Allaert, y Escolá, 2002).

La actividad enzimática se reportó con una escala hedónica en la que (+ + +) significa la mayor actividad enzimática obtenida, (+ +) es considerado como una actividad enzimática media y (+)

da a conocer que la actividad enzimática es pobre; ya una sigla (-) significa que la cepa no tuvo actividad enzimática ante el sustrato probado (UNAD, 2016).

Selección de Cepas Hidrolíticas

Para llevar una adecuada selección de cepas se consideraron diferentes aspectos como la capacidad hidrolítica, de esporulación, la morfología macroscópica, y tinción Gram.

Esporulación

Se llevó a cabo esta prueba para determinar la capacidad esporulante de las cepas aisladas. En placas de 24 pozos se colocó 1 mL de etanol estéril al 60% (v/v). Con un asa bacteriológica se inoculó solo uno de los pozos, repitiendo el proceso con el total de cepas aisladas (Harrold y col., 2008).

Las placas se agitaron 200 rpm a 50°C por 1 hora según Zhao y col., (2008). Pasado el tiempo de agitación, con un asa bacteriológica se inoculó cada pozo en placas Petri con 5 ó 10 mL agar nutritivo.

Para asegurar que se obtuvieron cepas esporulantes, se les realizó una tinción de Wirtz-Conklin para revelar esporas. Se hizo una fijación de la cepa en un portaobjetos, seguido de una tinción con el colorante verde de malaquita, donde, se flameó por debajo del portaobjetos hasta que el líquido del colorante soltara vapores, así durante 4 minutos. Pasado este tiempo, se enjuagó con agua destilada, y después, se tiñó con el colorante safranina por 1 minuto. Al finalizar el tiempo, se retiró el exceso con agua destilada.

Morfología

El análisis morfológico de las colonias de cepas aisladas se realizó según la forma, elevación y los bordes que presentaban en agar nutritivo de acuerdo con la Figura 7 (Prescott y col., 2011).

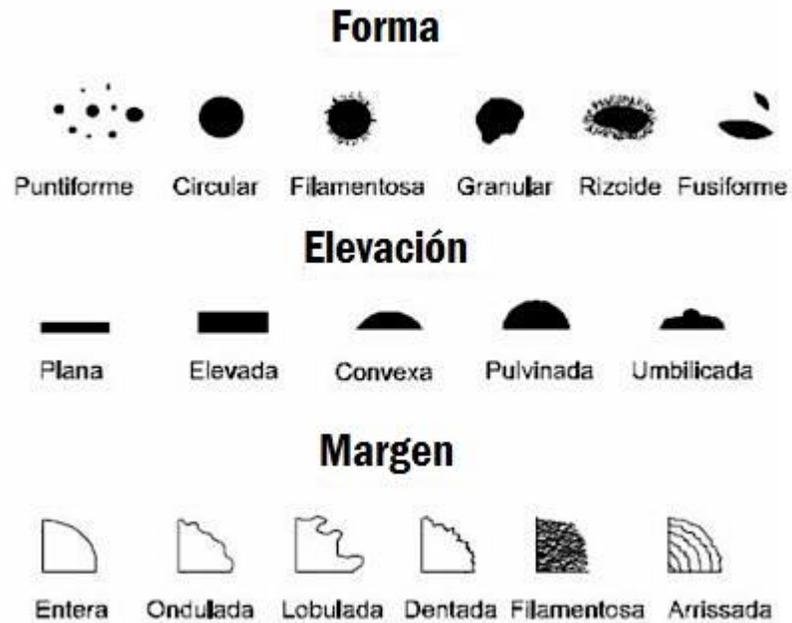


Figura 7. Morfología macroscópica colonial
(Prescott et al., 2011).

Tinción Gram

Para el análisis microscópico de las cepas se utilizó la metodología descrita en (Bailey y col., 2014) para realizar la tinción Gram.

Tamizaje Hidrolítico de Bacterias con Capacidades Esporulantes a Diferentes Valores de pH

Una vez seleccionadas las cepas por su capacidad esporulante, morfología macroscópica y microscópica, tinción Gram, se realizó el tamizaje hidrolítico con las bacterias esporulantes en diferentes rangos de pH usando como sustrato leche descremada, almidón, tributirina (TC4) y trioctanoína (TC8).

Se utilizó el medio que se conformó de peptona al 0.3%, extracto de levadura al 0.3%, agar al 2% y con los diferentes sustratos ya mencionados al 2%. Para medir la actividad amilolítica

se evaluó en pH 4.3, 7.0 y 9.0. Para la actividad proteolítica, los pH que se utilizaron fueron 5.3, 7.0 y 9.0. En el caso para la actividad lipolítica, se utilizaron pH de 5.5 y 8.0.

En placas estériles de 24 pozos se colocó 1mL del medio de cultivo correspondiente para cada actividad hidrolítica a medir. Finalizada la solidificación del medio, se sembraron las cepas seleccionadas por picadura. Las placas se incubaron por 24 horas a 37°C. Pasado el tiempo, se revelaron las placas para medir la capacidad hidrolítica de amilasa y las de proteasa con sus reveladores correspondientes.

La actividad enzimática se reportó con una escala hedónica donde (+ + +) significa la mayor actividad (+ +) es considerado como una actividad amilolítica media y (+) da a conocer que la actividad enzimática es pobre; ya una sigla (-) significa que la cepa no tuvo actividad enzimática ante el sustrato probado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron un total de 144 cepas aisladas de diferentes puntos, de las cuales 62 de ellas provienen del municipio de Ures, y las 82 restantes, corresponden al municipio de Hermosillo, Sonora.

Tamizaje Hidrolítico

Las 144 cepas se sometieron a diferentes pruebas para seleccionar únicamente las bacterias con las capacidades proteolíticas, amilolíticas, lipolíticas y esporulantes, con excepción de las cepas aisladas de la curtiduría de pieles, ya que, el criterio de selección para ellas fue la capacidad proteolítica, amilolítica y lipolítica, de las 82 cepas aisladas del municipio de Hermosillo, 10 de ellas fueron aisladas de puntos considerados de curtiduría de pieles, de las cuales 6 presentaron actividad de la enzima amilasa y 7 de ellas presentaron actividad proteolítica.

Selección de Cepas Hidrolíticas

Eliminación de Cepas Fúngicas

Se excluyeron las cepas aisladas de la curtiduría de pieles en la prueba para eliminar las cepas fúngicas. De las 134 restantes cepas aisladas, fueron sometidas a un crecimiento en agar nutritivo con donde se le añadió ketoconazol al 25% para inhibir el crecimiento de cepas fúngicas.

Cepas Esporulantes

Las 134 cepas fueron expuestas a la prueba para obtener solo las cepas esporulantes. Siguiendo la metodología de (Zhao y col., 2008) se utilizaron los cultivos de 10 días de las 134 cepas, y por medio del método de lavado con etanol, se obtuvieron los siguientes resultados:

Del total de las 62 cepas provenientes de Ures, 32 de ellas tuvieron la capacidad de esporular. En las cepas aisladas de Hermosillo, de 72 cepas, sólo 7 fueron cepas esporulantes. Los resultados se resumen en las Tablas 3 y 4, donde se especifican la cantidad de cepas aisladas correspondientes a las áreas de donde se aislaron. En la Figura 8 se observa la tinción de Wirtz-Conklin realizada para comprobar si las cepas eran esporulantes.

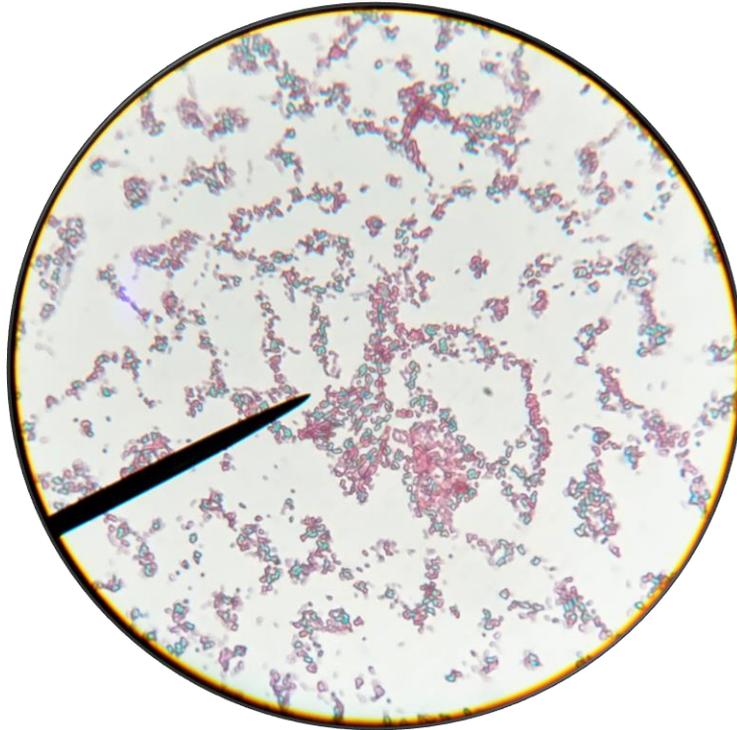


Figura 8. Tinción de esporas de la cepa 2OR1-A

Tabla 3. Cantidad de cepas aisladas en el rancho de Ures, Sonora.

Punto de Muestra	Cantidad de Cepas Aisladas
1OR	4
2OR	8
1AB	6
2AB	4
1D	3
2D	4
Mixta	3

Tabla 4. Cantidad de cepas aisladas en el rancho de Hermosillo, Sonora.

Punto de Muestra	Cantidad de Cepas Aisladas
AA2	1
AA3	1
AE4	1
AT2	2
AT1	2

Morfología y Tinción Gram

Según (Tortora y col., 2013) tanto para la morfología macroscópica y microscópica, las bacterias pueden ser catalogadas dependiendo de las características que presente. El estudio de la morfología de las 49 cepas seleccionadas por su capacidad hidrolítica se muestran en las Tablas 5 y 6, donde la forma que predomina más son las colonias puntiformes, la elevación plana fue el mayor número obtenido y la mayoría de las cepas son traslúcidas.

Se le realizó la tinción Gram como se observa en las Figuras 9 y 10. Se catalogó a las 49 cepas de interés. En la tabla 7 se muestran la cantidad de cepas que dieron Gram positivas G (+) y el número de cepas que dieron Gram negativas (-).

Tabla 5. Morfología macroscópica de las cepas con capacidad hidrolítica.

Característica	Cantidad			
Forma	Puntiforme	Circular	Filamentosa	Granular
	18	11	10	10
Elevación	Plana	Elevada	Convexa	Umbilicada
	24	5	16	5
Color	Beige	Blanco	Traslúcida	Naranja
	8	19	21	1

Tabla 6. Morfología macroscópica del margen de las cepas con capacidad hidrolítica.

Característica	Cantidad					
	Entera	Ondulada	Lobulada	Dentada	Filamentosa	Arrizada
Margen	17	9	4	9	7	3

Tabla 7. Tinción Gram de las cepas con capacidad hidrolítica.

Característica	Cantidad	
Gram	Gram positivas	Gram negativas
	32	17

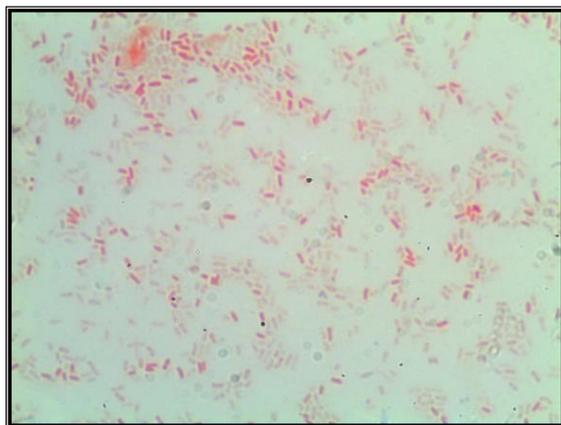


Figura 9. Tinción Gram negativa, cepa PR-22.

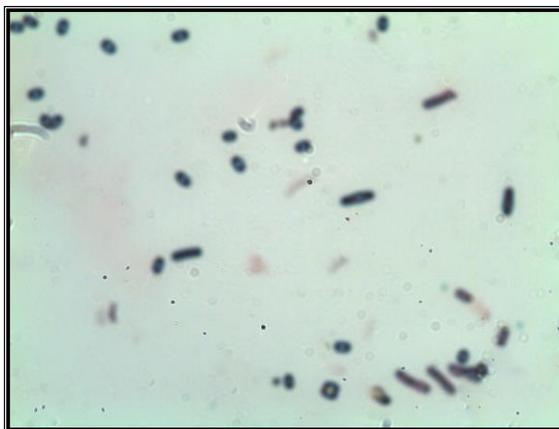


Figura 10. Tinción Gram positiva, cepa 1AB2-P.

Tamizaje Hidrolítico de Bacterias Esporulantes a Diferentes pH

Actividad proteolítica. Las proteasas pueden ser clasificadas dependiendo de las capacidades que tienen en los diferentes rangos de pH como por ejemplo aquellas proteasas ácidas (trabajan en rangos e pH 3.0 a 5.0) y proteasas alcalinas (actúan en rangos de pH de 8.0 a 10.0), y sí son bioproducidas por microorganismos, le confieren capacidades de gran utilidad para la industria, ejemplificando con las proteasas producidas por bacterias halófilas o por las que viven en simbiosis con otros organismos como plantas (Homaei y col., 2016).

En la Figura 11 se muestra el tamizaje proteolítico que se realizó a las cepas esporulantes para conocer la capacidad preotolítica de cada una de ellas. En la columna seis se aprecian los pozos de control que no han sido inoculado, de las columnas uno hasta la cinco, se inocularon las cepas aisladas dando diferentes resultados. Entre más verde se encuentre el pozo, tendrá una escala hedónica mayor. Se consideró negativo (-) el pozo que tenga la misma coloración que los controles no inoculados.

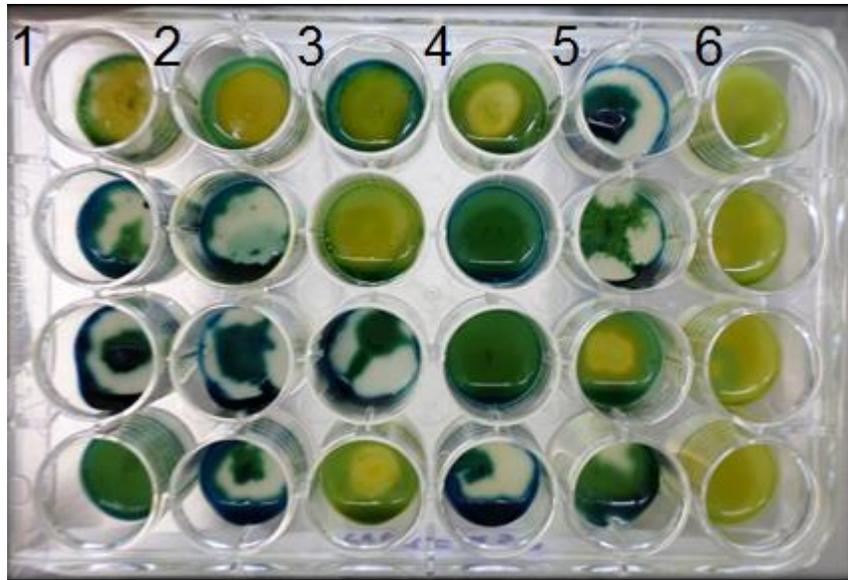


Figura 11. Tamizaje proteolítico de las cepas aisladas de Ures y Hermosillo.

Del total de las cepas probadas, un aproximado de 18 cepas se consideraron de mayor interés por su gran capacidad proteolítica en los diferentes valores de pH. Sugiere Ibrahim y col. (2015), que las proteasas con una mayor actividad y estabilidad son aquellas que actúan en rangos altos de alcalinidad, por su diversidad de usos y aplicaciones en la bioingeniería y biotecnología.

En otros estudios se han aislado bacterias a partir de suelos que son utilizados para la agricultura. Saxena y col. (2014) aisló de suelos del Instituto central para la búsqueda salinidad en suelo 178 colonias, de las cuales solo 20 eran productoras proteasas que actuaban en pH alcalinos.

Mageswari y col. (2016) aisló muestras de suelo del occidente de la región cercana al Himalaya, obteniendo 22 cepas donde su temperatura de crecimiento óptima de 15°C, y además, eran productoras de proteasas, seleccionando a la cepa *Chryseobacterium sp* que contaba con las mayores actividades proteolíticas a temperaturas de 5°C a pH de 7.0.

Se tiene reportadas cepas de bacterias que presentan actividad proteolíticas como la cepa *Bacillus licheniformis* aislada por Baraniya y col. (2016) aislada de los suelos de plantíos de manzanos, la cual era productora de proteasa alcalina.

Hmidet y col. (2009), que observaron el efecto del pH en la actividad proteolítica en la cepa de *Bacillus licheniformis* aislada del fango, en donde la mayor actividad obtenida fue dentro de los rangos de pH 7-12 y la actividad óptima fue cuando el pH era de 10.0, siendo esto de

importancia ya que en la industria de los detergentes el pH utilizado en los procesos es de 9.0 - 10.0.

Raval y col. (2014) menciona que las proteasas alcalinas (pH de 8.0 -10.0) son de gran utilidad en muchos sectores de la industria, como el del procesamiento del cuero o plumas, producción de alimentos, medicamentos y detergentes.

Phanse y col. (2013) indica que en la industria de los detergentes se ha incrementado el costo del tratamiento de desechos alcalinos, por lo que consideran esencial la utilización de enzimas alcalinas. Actualmente muchas industrias buscan adentrarse en una producción más eco-amigable, introduciendo tecnologías sustentables más limpias, y es por eso, que las enzimas como las proteasas alcalinas se convierten en una herramienta importante para el ecosistema e industrias (Briki y col., 2016). En la Tabla 8 y 9 se presentan las cepas aisladas con y la capacidad proteolítica que presentan en los diferentes rangos de pH.

De las 9 cepas aisladas de curtiduría de pieles, sólo 3 mostraron una mayor actividad proteolítica en los diferentes pH, y una cepa mostro actividad pobre a pH de 9, mostrando que la actividad de la proteasa no solo se limita a tener acción en pH alcalino como lo mostró Saxena y col. (2014).

En las 40 cepas restantes, se logra a notar que la mayoría de las cepas no presentan la actividad proteolítica pH ácidos. Solo 15 de ellas tienen actividad, donde 7 de ellas presentan una actividad pobre.

Tanto los aislamientos de Mageswari y col. (2016), Baraniya y col. (2016) y Hmidet y col. (2009) presentan cepas con actividad proteolítica entre los rangos de pH 7-12, lo cual, concuerda con los resultados obtenidos. De 40 cepas aisladas, 22 presentaron actividad proteolítica a pH 7 y pH 9, 3 cepas presentaron actividad para pH 7 pero no para pH 9 y solo una cepa presento actividad proteolítica para pH9 y no para pH 7.

Estos resultados son de importancia, ya que reflejan la posibilidad de encontrar cepas bacterianas que produzcan proteasas que tengan actividad proteolítica en rangos de pH 7 - 9, ya que, como mencionan Phase y col. (2013) y Raval y col. (2014), la industria hace uso de las proteasas alcalinas en gran medida en diferentes aplicaciones.

Tabla 8. Capacidad proteolítica de las cepas aisladas de Ures.

No.	Cepa	pH 7	pH 5.3	pH 9
1	2AB2-A	++	-	++
2	2D2-A	-	-	-
3	1AB1-A	++	+	+
4	2OR2-A	++	++	++
5	1OR1-A*	+	-	+
6	1OR1-A	+	-	-
7	2OR1-A*	+	-	-
8	2OR1-A	+++	+++	++
9	1OR2-A	-	-	-
10	1D2-A	-	-	-
11	2AB1-A	++	+	++
12	1AB2-A	-	-	-
13	1AB2-P	+++	+++	+++
14	1AB1-P*	+++	++	+
15	1OR2-P	++	+	+++
16	1AB1-P	+++	++	+++
17	1AB2-P*	++	-	++
18	2D1-P	+	+	-
19	2AB2-P	+++	+	+
20	2OR1-P	++	-	-
21	2OR1-P*	++	-	+
22	2D2-P	-	-	-
23	2OR2-P	++	+	+++
24	2OR2-P*	++	+	+++
25	1D1-P	+	-	+
26	MIX2-P	-	-	-
27	2OR1-4	+	+	++
28	MIX2-4	++	-	-
29	1D2-P	-	-	-
30	2AB2-P*	-	-	-
31	MIX2-8	+	-	+
32	2D1-8	-	-	+

Tabla 9. Capacidad proteolítica de las cepas aisladas de Hermosillo.

No.	Cepa	pH 7	pH 5.3	pH 9
33	AA2-22	+	-	+
34	AA3-22	++	+++	+++
35	AT1-21	-	-	-
36	AT1-11	+	-	++
37	AT2-21	-	-	-
38	AT2-22	-	-	-
39	AE4-21	-	-	+
40	PR-22	+++	+++	+++
41	1-1k1	-	-	-
42	1-1k2	++	++	+++
43	1-2k1	-	-	+
44	1-3k1	-	-	-
45	1-3k2	-	-	-
46	2-2k1	++	+++	+++
47	2-2k	-	-	-
48	2-3k1	-	-	-
49	2-3k2	+++	+++	+++

De las 34 cepas con capacidad proteolítica destacan cinco cepas, presentando una escala de (+ + +) en la actividad proteolítica a pH 9, así como, una mayor actividad proteolítica a pH de 7 y 5. El que estas cinco cepas tengan actividad proteolítica en el rango alcalino, las convierte en candidatas potenciales para ser utilizadas en la industria de alimentos, medicamentos y detergentes, o para procesos de degradación de sustancias contaminantes del medio ambiente.

Una ventaja de que estas cepas hayan sido aisladas de climas extremos y que tengan la cualidad de ser cepas esporulantes es que la actividad de las enzimas que producen en su metabolismo tiene mayor acción a diferentes condiciones no favorables, gracias a los diferentes ecosistemas del suelo en los que la enzima ha interactuado con distintas condiciones nutricionales en el suelo (Hu y col., 2016).

Actividad amilolítica. Por otro lado, para la actividad amilolítica se utilizó almidón como sustrato evaluándose la actividad de la enzima en los rangos de pH de 4, 7 y 9. Señala (Asoodeh y col., 2010), que las amilasas biosintetizadas por las bacterias muestran características de importancia mencionando la capacidad termófila, la termotolerancia y propiedades alcalinas y ácidas que son utilizadas en la producción de alimentos, como también en industrias textiles y farmacéuticas.

En la figura 12 se muestra el tamizaje hidrolítico que se realizó a las cepas esporulantes para conocer la capacidad amilolítica. En la columna seis se aprecian los pozos de control que no han sido inoculados, de las columnas uno hasta la cinco, se inocularon las cepas aisladas dando diferentes resultados. Se consideró negativo (-) el pozo que poseía la misma coloración que los controles no inoculados que en su caso fueron de un color café oscuro. Entre más grande sea el halo de hidrólisis, mayor será el valor asignado en la escala hedónica.



Figura 12. Tamizaje amilolítico de las cepas aisladas de Ures y Hermosillo.

De suelos se han aislado cepas de bacterias productoras de amilasas. Choubane y col. (2016) aislaron cepas de bacterias amilolíticas a partir de suelo en donde se encontraban diferentes especies de plantas, encontrando que las bacterias aisladas de rizosferas de regiones áridas eran las mayores productoras en comparación de las demás bacterias aisladas en su estudio.

En muestras de suelos se pueden aislar microorganismos productores de las β -amilasas como la bacteria reportada por Mihajlovski y col. (2016) *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, la cual usaba melaza como su sustrato.

Hay bacterias productoras de α -amilasa aisladas de suelos como en el estudio de Abd y col. (2015) donde aisló de muestras de suelo 133 cepas bacterianas y solo 33 tuvieron actividad amilolítica, resaltando que la *Bacillus amyloliquefaciens* aislada fue la que presentó la mayor actividad amilolítica.

También Shukla y Singh (2015) aisló a partir de suelos cercanos de aguas termales la cepa *Laceyella sacchari* TSI-2, la cual era productora de α -amilasa que presentaba estabilidad a temperaturas dentro de los rangos de 50°C a 80°C y a pH dentro de los rangos de 6.0 a 9.0.

Roy y Mukherjee (2013) indican que la α -amilasa con actividad a pH mayores a 8.0 y temperaturas altas de hasta 75°C, son ampliamente utilizadas en el proceso de sacarificación del almidón, producción de bioetanol y detergentes. Por otro lado, otro uso importante de las amilasas es la obtención de maltosa a partir de la hidrólisis del almidón, que es utilizado en aplicaciones alimenticias, farmacéuticas y químicas. En la Tabla 10 y 11 se presentan las cepas aisladas con y la capacidad proteolítica que presentan en los diferentes rangos de pH.

De las 9 cepas aisladas de curtiduría de pieles, la actividad en pH dentro de los rangos 7 - 9 es mayor que la actividad presentada en pH 4, ya que solo 3 cepas pudieron ser capaces de tener actividad a ese pH. Sin embargo, la actividad amilolítica tanto para pH 7 y 9 que presentaban las cepas en su gran mayoría era de actividad pobre. Si se comparan los resultados de las cepas aisladas de ambientes agrícolas, la actividad amilolítica en la mayoría de las cepas era considerada de mayor actividad, y esto concuerda con los resultados de Choubane y col. (2016).

En las 40 cepas aisladas de ambiente de ganado vacuno, 35 presentó actividad amilolítica en pH 4, 7 y 9; 2 cepas presentaron actividad para pH 4 y 9 y otras 2 para pH 4 y 7, por último, solo una cepa presentó actividad amilolítica en pH 7 y 9. Estos resultados reflejan que las cepas aisladas de ambiente agrícola presentan actividad amilolítica en un amplio rango de pH, parecido a los de la cepa aislada por Shukla y Singh (2015). Existiendo la posibilidad de utilizar las cepas aisladas en la industria (Roy y Mukherjee, 2013).

Tabla 10. Capacidad amilolítica de las cepas aisladas de Ures.

No.	Cepa	pH 7	pH 4	pH 9
1	2AB2-A	++	++	+
2	2D2-A	+	+	+
3	1AB1-A	++	++	++
4	2OR2-A	++	+	+
5	1OR1-A*	++	+	+++
6	1OR1-A	++	+++	+++
7	2OR1-A*	++	++	++
8	2OR1-A	++	++	+
9	1OR2-A	+	++	-
10	1D2-A	++	+	++
11	2AB1-A	++	+++	+
12	1AB2-A	++	++	+++
13	1AB2-P	+	+	+
14	1AB1-P*	++	+	+++
15	1OR2-P	+	++	+
16	1AB1-P	+	++	+
17	1AB2-P*	+++	++	++
18	2D1-P	+	++	++
19	2AB2-P	+	++	+
20	2OR1-P	+	++	+
21	2OR1-P*	+	+	+
22	2D2-P	++	++	+
23	2OR2-P	++	+	++
24	2OR2-P*	++	+	+
25	1D1-P	+++	+	++
26	MIX2-P	-	+	+
27	2OR1-4	+	+++	+
28	MIX2-4	++	+	++
29	1D2-P	+	++	++
30	2AB2-P*	+	++	+
31	MIX2-8	+	++	+
32	2D1-8	+	++	++

Tabla 11. Capacidad amilolítica de las cepas aisladas de Hermosillo.

No.	Cepa	pH7	pH4	pH9
33	AA2-22	+	++	+
34	AA3-22	+++	+++	+++
35	AT1-21	++	++	+
36	AT1-11	-	++	+++
37	AT2-21	++	++	+
38	AT2-22	++	+	-
39	AE4-21	-	++	+
40	PR-22	++	-	+++
41	1-1k1	+	-	+
42	1-1k2	++	-	+++
43	1-2k1	-	-	-
44	1-3k1	++	++	++
45	1-3k2	+	-	++
46	2-2k1	++	+	+
47	2-2k	-	-	+
48	2-3k1	+	+	+
49	2-3k2	++	-	+++

De las 49 cepas evaluadas para la actividad amilolítica, 20 cepas fueron de interés por destacar en los diferentes rangos de pH probados, contando con cinco de ellas que fueron en su mayoría (+ + +) en la escala hedónica utilizada. Conforme a lo mencionado, existe un gran potencial para que estas cinco cepas, por su buena capacidad amilolítica, puedan ser utilizadas en la industria alimentaria, farmacéutica, de textiles, etc.

Actividad lipolítica. Se utilizaron rangos de pH de 5.5 y 8.0 considerando que el rojo de fenol, el cual es utilizado como revelador de la prueba, vira al color amarillo debajo de 6.5 de pH y se torna color rojo/guinda cuando el pH es mayor a 8.0.

En la Figura número 13 se muestra el uso de la tributirina como sustrato a un pH 8, ya que fue el pH en el cual hubo una acción lipolítica. En la columna seis se aprecian los pozos de control

que no han sido inoculados, de las columnas uno hasta la cinco, se inocularon las cepas aisladas dando diferentes resultados.



Figura 13. Tamizaje lipolítico con tributirina de las cepas aisladas de Ures y Hermosillo.

En la Figura 14, se puede notar que se utilizó como sustrato la trioctanoína a un pH 8. Los resultados de todas las cepas probadas en la placa dieron una coloración como la de los controles no inoculados que se encuentran en la columna seis.

Se consideró negativo (-) el pozo que tenga la misma coloración que los controles no inoculados que en su caso serán de un color guinda. Entre mayor sea el viraje de color de rojo a amarillo, mayor será la escala hedónica que la cepa obtenga.

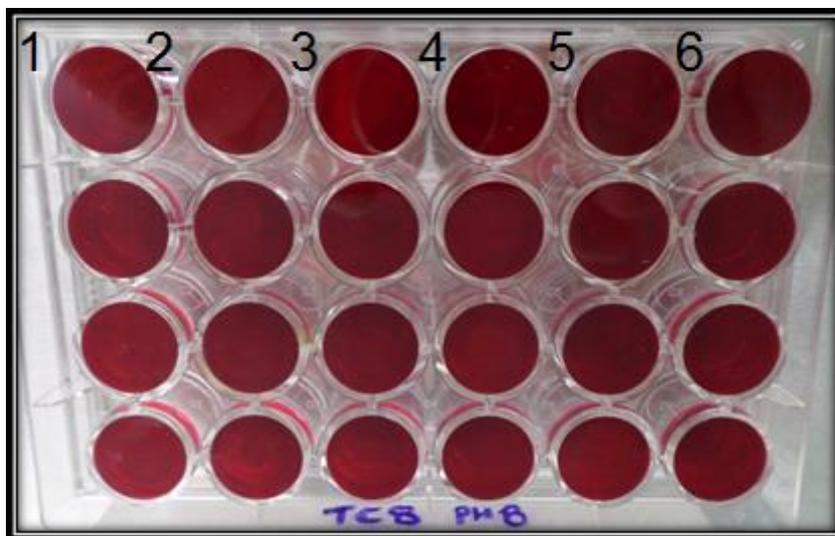


Figura 14. Tamizaje lipolítico con trioctanoína de las cepas aisladas de Ures y Hermosillo.

De las 49 cepas evaluadas con ambos sustratos y a los diferentes valores de pH, sólo nueve de ellas mostraron baja actividad para la tributirina a pH 8. Este comportamiento puede atribuirse a que la tributirina es un triglicérido más fácil y eficiente de hidrolizar por la enzima lipasa, debido a que la cadena de carbonos es corta en comparación con la trioctanoína, ya que, la enzima tiene una mayor función hidrolítica cuando el pH está más cercano a 7.0 (Camacho y col., 2005).

En general, de las cepas aisladas tanto en Ures y como en Hermosillo, Sonora, no se encontró ninguna lipolítica importante, en comparación con la actividad proteolítica y amilolítica. En el estudio de Gutiérrez y col. (2016) se aislaron bacterias a partir de suelos de salineras. *Halomonas* sp fue la cepa que mayor actividad obtuvo en la degradación de tributirina a un pH óptimo entre los rangos 6.2 - 7.5, utilizando concentraciones altas de sal para solo tener crecimiento de bacterias halófilas.

De muestras de suelo de un parque recreativo en China, Yang y col. (2016) aislaron la cepa *Burkholderia ubonensis* SL-4 la cual mostró la mayor actividad lipolítica del estudio. El rango óptimo de actividad era a un pH de 8.5 a una temperatura de 65°C, mostrando la termoestabilidad de la enzima.

De igual manera Gricajeva y Kalediene (2016) a partir de muestras de suelo contaminado con aceite aislaron a las cepas *Bacillus pumilus* y *Bacillus stratosphericus*, observando que son productoras de lipasas con una actividad óptima a pH 9.0 y temperatura dentro del rango de 30 -

35°C. Dentro del estudio observaron que las cepas tenían un gran potencial en procesos de emulsificación.

Menciona Horchani y col. (2012) que las lipasas bioproducidas por microorganismos tienen un gran potencial que es utilizado en diferentes aplicaciones así como en industrias como la alimentaria, industria de lácteos, farmacéutica, detergentes, textiles, producción de biodiesel, etc. Señala Ülker y Karaoğlu (2012) que las lipasas son producidas por diferentes organismos, pero que las que son utilizadas en la biotecnología son obtenidas de bacterias y hongos. Sin embargo, hace resaltar que preferentemente se utilizan a los hongos filamentosos ya que son una fuente de lipasa que se secreta de manera extracelular. En la Tabla 12 y 13 se presentan las cepas aisladas con y la actividad lipolítica que presentan en los diferentes rangos de pH.

En las cepas aisladas de curtiduría de pieles, ni una de las 9 cepas presentó actividad lipolítica para tributirina o trioctanoína. Las muestras aisladas de curtiduría de pieles no fueron colectadas de suelo, lo cual puede ser objeto de comparación con los resultados de Gutiérrez y col. (2016), ya que el obtuvo aislamiento de cepas halófilas con actividad lipolítica en tributirina, y este estudio puede mostrar como las condiciones en donde estén presentes las bacterias modifica la producción de enzimas.

De las 40 cepas aisladas de ambiente de ganado vacuno, sólo nueve presentaban actividad lipolítica a tributirina en pH 8. Tres de ellas presentaban actividad media y las seis restantes presentaban actividad pobre. Los aislamientos de Yang y col. (2016) y Gricajeva y Kalediene (2016) muestran como las cepas productoras de lipasas tenían actividad óptima a pH 8.5 - 9, lo cual concuerda con los resultados obtenidos ya que no hubo actividad lipolítica de tributirina a pH 5.5.

Tabla 12. Capacidad lipolítica de las cepas aisladas de Ures

No.	Cepa	TC4 pH 5.5	TC4 pH 8	TC8 pH 5.5	TC8 pH 8
1	2AB2-A	-	++	-	-
2	2D2-A	-	-	-	-
3	1AB1-A	-	-	-	-
4	2OR2-A	-	-	-	-
5	1OR1-A*	-	-	-	-
6	1OR1-A	-	-	-	-
7	2OR1-A*	-	-	-	-
8	2OR1-A	-	-	-	-
9	1OR2-A	-	-	-	-
10	1D2-A	-	-	-	-
11	2AB1-A	-	-	-	-
12	1AB2-A	-	-	-	-
13	1AB2-P	-	-	-	-
14	1AB1-P*	-	-	-	-
15	1OR2-P	-	-	-	-
16	1AB1-P	-	-	-	-
17	1AB2-P*	-	+	-	-
18	2D1-P	-	-	-	-
19	2AB2-P	-	+	-	-
20	2OR1-P	-	-	-	-
21	2OR1-P*	-	+	-	-
22	2D2-P	-	-	-	-
23	2OR2-P	-	+	-	-
24	2OR2-P*	-	-	-	-
25	1D1-P	-	-	-	-
26	MIX2-P	-	++	-	-
27	2OR1-4	-	-	-	-
28	MIX2-4	-	-	-	-
29	1D2-P	-	-	-	-
30	2AB2-P*	-	-	-	-
31	MIX2-8	-	-	-	-
32	2D1-8	-	-	-	-

Tabla 13. Capacidad lipolítica de las cepas aisladas de Hermosillo

No.	Cepa	TC4 pH5.5	TC4 pH8	TC8 pH5.5	TC8 pH8
33	AA2-22	-	-	-	-
34	AA3-22	-	-	-	-
35	AT1-21	-	+	-	-
36	AT1-11	-	-	-	-
37	AT2-21	-	-	-	-
38	AT2-22	-	-	-	-
39	AE4-21	-	+	-	-
40	PR-22	-	++	-	-
41	1-1k1	-	-	-	-
42	1-1k2	-	-	-	-
43	1-2k1	-	-	-	-
44	1-3k1	-	-	-	-
45	1-3k2	-	-	-	-
46	2-2k1	-	-	-	-
47	2-2k	-	-	-	-
48	2-3k1	-	-	-	-
49	2-3k2	-	-	-	-

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró aislar cepas de microorganismos hidrolíticamente activas que provenían de ambientes de ganado vacuno de los municipios de Ures y Hermosillo, Sonora.

Se hizo una selección de cepas provenientes de los municipios de Ures y Hermosillo que presentan capacidad esporulante y se logró realizar tamizajes enzimáticos para conocer sus actividades amilolíticas, proteolíticas y lipolíticas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abel-Santos, E. 2012. Bacterial spores: current research and applications. Mechanisms of bacterial spore survival. Las Vegas, USA: Caister Academic Press.
- Abril, A. 2005. Manejo de hábitat y microorganismos para degradar efluentes industriales: un estudio de caso. *Ecología austral*, 15, 9-16.
- Abd BT, El SM, Gamal RF, Abou KA. 2015. Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 193-202.
- Abu BS, Noor AR, Mahiran B. 2006. *New lipases and proteases*. New York: Nova Science Publishers.
- Alais C, Lacasa GA. 2003. *Ciencia de la leche: Principios de técnica lechera*. Barcelona: Reverté. Pag. 267.
- Allaert VC, Escolá RM. 2002. *Métodos de análisis microbiológicos de alimentos*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos. Pag. 174.
- Ammann AB, Kölle L, Brandl H. 2011. Detection of Bacterial Endospores in Soil by Terbium Fluorescence. *International Journal of Microbiology*, 1-5.
- Anbu P. 2013. Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). *International Journal of Biological Macromolecules*, 56(0), 162-168.
- Aravindan R, Anbumathi P, Viruthagiri T. 2006. Lipase applications in food industry. *Indian Journal of Biotechnology* Vol 6, April 2007, pp 141-158.
- Asoodeh A, Chamani J, Lagzian M. 2010. A novel thermostable, acidophilic α -amylase from a new thermophilic "Bacillus sp. Ferdowsicus" isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(3), 289-297.
- Bailey WR, Scott EG, Tille PM, Mosby C. 2014. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. St. Louis: Mosby.
- Brayer GD, Luo Y, Withers SG. 1995. The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Science*, 4(9), 1730-1742.
- Briki S, Hamdi O, Landoulsi A. 2016. Enzymatic dehairing of goat skins using alkaline protease from *Bacillus* sp. SB12. *Protein Expression and Purification*, 121, 9-16.
- Carrizosa S, Casas IA. 2000. *La bioprospección y el acceso a los recursos genéticos: Una guía práctica*. Bogotá, D.C., Colombia: Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca.

- Camacho F. Jurado E. Luzón G. Fernández M. García M. 2005 Hidrólisis enzimática de tributirina en emulsiones O/W. Universidad de Granada.
- Cavalcante FF. Resende AP. de Andrade CJ. Pastore GM. 2013. Production of Enzymes from Agroindustrial Wastes by Biosurfactant-Producing Strains of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Research International*, 1-9.
- Chatterjee S. 2015. Production and estimation of alkaline protease by immobilized *Bacillus licheniformis* isolated from poultry farm soil of 24 Parganas and its reusability. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 6(1), 2-6.
- Chávez GV. 2007. Producción de la enzima proteasa en cultivo en medio sólido y líquido utilizando *Rhizopus oryzae*. México: Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". Tesis de licenciatura.
- Choubane S. Cheba BA. Benourrad A. 2016. Screening and Phenotypic Diversity of Amylase Producing Rhizospheric Bacteria from Some North African Plants. *Procedia Technology*, 22, 1197-1204.
- Cockburn D. Nielsen MM. Christiansen C. Andersen JM. Rannes JB. Blennow A. Svensson B. 2015. Surface binding sites in amylase have distinct roles in recognition of starch structure motifs and degradation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75(0), 338-345.
- de Almeida CR. Marques V. Montezano J. de Azevedo D. Seldin L. 2015. Exploiting the aerobic endospore-forming bacterial diversity in saline and hypersaline environments for biosurfactant production. *BMC Microbiology*, 15, 1-17.
- Derde LJ. Gomand SV. Courtin CM. Delcour JA. 2012. Characterisation of three starch degrading enzymes: Thermostable β -amylase, maltotetraogenic and maltogenic α -amylases. *Food Chemistry*, 135(2), 713-721.
- Devlin TM. 2004. *Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas*. Barcelona, España.: Reverté.
- Dheeman DS. Frias JM. Henahan TM. 2010. Influence of cultivation conditions on the production of a thermostable extracellular lipase from *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(1), 1-17.
- Forbes BA. Bailey WR. Scott EG. Sahm DF. Weissfeld AS. y Trevino, EA. 2009. *Bailey & Scott diagnóstico microbiológico*. Buenos Aires: Panamericana.
- García V. 2004. *Introducción a la Microbiología*. EUNEDPais: Costa Rica. Edición 2004. Pag. 51 (256)

- Garrett R. y Grisham CM. 2013. *Biochemistry*. Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning.
- Gutiérrez E. Rodríguez A. Sanromán MA. Deive FJ. 2016. New sources of halophilic lipases: Isolation of bacteria from Spanish and Turkish saltworks. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 170-177.
- Harrold ZR. Hertel MR. Gorman D. 2011. Optimizing *Bacillus subtilis* spore isolation and quantifying spore harvest purity. *Journal of Microbiological Methods*, 87(3), 325-329.
- Hmidet N. El N. Haddar A. Kanoun S. Alya SK. Nasri M. 2009. Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal*, 47(1-3), 71-79.
- Homaei A. Lavajoo F. Sariri R. 2016. Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 542-552.
- Horchani H. Aissa I. Ouertani S. Zarai Z. Gargouri Y. Sayari A. 2012. Staphylococcal lipases: Biotechnological applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 76, 125-132.
- Hu R. Wang X. Zhang Y. Shi W. Jin Y. Chen N. 2016. Insight into the influence of sand-stabilizing shrubs on soil enzyme activity in a temperate desert. *CATENA*, 137, 526-535.
- Ibrahim AS. Al AA. Elbadawi YB. El MA. Ibrahim SSS. 2015. Production of extracellular alkaline protease by new halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15 isolated from hyper saline soda lakes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(3), 236-243.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2014). Sistema Estatal y Municipal de base de datos. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx>. (Fecha de acceso: 13 de marzo de 2016).
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2012). Principales características del sector en 2014 según Producción ganadera. Disponible en: <http://sc.inegi.org.mx/cobdem/filtroContenidosServlet>. (Fecha de acceso: 13 de marzo de 2016).
- Kanchiswamy CN. Malnoy M. Maffei ME. 2015. Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. *Trends in Plant Science*, 20(4), 206-211.
- Lieberman M. Marks AD. Peet A. 2013. *Marks' basic medical biochemistry : a clinical approach*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Lin S. Zhang M. Liu J. Jones GS. 2015. Construction and application of recombinant strain for the production of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(3), 284-288.

- López M. 2001. Degradación de suelos en Sonora: el problema de la erosión en los suelos de uso ganadero. *Región y Sociedad*, 13(22)
- Mageswari A. Subramanian P. Chandrasekaran S. Karthikeyan S. Gothandam KM. 2016. Systematic functional analysis and application of a cold-active serine protease from a novel *Chryseobacterium* sp. *Food Chemistry*, 217, 18-27.
- Martínez E. Bernal L. 2005. Una nueva visión de la degradación del almidón. México: Departamento de Bioquímica. *Revista del Centro de investigación. Universidad La Salle*, 2006, 7 (25).
- Mateos E. Rodríguez J. de los Ángeles M. Mateos J. 2012. High-Throughput Screening Method for Lipases/Esterases. In G. Sandoval (Ed.), *Lipases and Phospholipases* (Vol. 861, pp. 89-100): Humana Press.
- Mehta VJ. Thumar JT. Singh SP. 2006. Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. *Bioresource Technology*, 97(14), 1650-1654.
- Melendez ML. 2004. Producción, extracción, purificación, usos y aplicaciones de la enzima amilasa en la industria de los alimentos. Universidad autónoma agraria "Antonio Narro". Tesis de licenciatura.
- Muñoz MA. 2014. Bioplásticos. *Ciencia Hoy*, volumen 23, número 138, abril-mayo 2014, Buenos Aires, Argentina. pp. 50-53.
- Natalia D. Vidilaseris K. Ismaya WT. Puspasari F. Prawira I. Hasan K. Soemitro S. 2015. Effect of introducing a disulphide bond between the A and C domains on the activity and stability of *Saccharomycopsis fibuligera* R64 α -amylase. *Journal of Biotechnology*, 195(0), 8-14.
- [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 1995. Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno : leguminosa. Vaile delle Terme di Caracalla, 00100 Roma, Italia: FAO.
- Palmer T. Bonner PLR. 2008. *Enzymes : biochemistry, biotechnology and clinical chemistry*. Chichester: Horwood.
- Phanse N. Rathore P. Patel B. Nayariseri A. 2013. Characterization of an industrially important alkalophilic bacterium, *Bacillus agaradhaerens* strain nandiniphanse5. *Journal of Pharmacy Research*, 6(5), 543-550.
- Prescott LM. Harley JP. Klein DA. Ruiz F. 2011. *Microbiología*. Madrid: Interamericana de España, McGraw-Hill.
- Raval VH. Pillai S. Rawal CM. Singh SP. 2014. Biochemical and structural characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from seawater haloalkaliphilic bacteria. *Process Biochemistry*, 49(6), 955-962.

- Rivera C. García F. 2007. Enzimas lipolíticas y su aplicación en la industria del aceite. *Biotecnología*, 11, 37-45.
- Romero CSR. Mestres LJ. 2004. *Productos lácteos: Tecnología*. Barcelona: UPC.
- Roy JK. Mukherjee AK. 2013. Applications of a high maltose forming, thermo-stable α -amylase from an extremely alkalophilic *Bacillus licheniformis* strain AS08E in food and laundry detergent industries. *Biochemical Engineering Journal*, 77, 220-230.
- Saxena S. Verma J. Shikha D. Raj Modi D. 2014. RAPD-PCR and 16S rDNA phylogenetic analysis of alkaline protease producing bacteria isolated from soil of India: Identification and detection of genetic variability. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 12(1), 27-35.
- SAGARPA, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2014) Resumen estatal pecuario., Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/ganaderia-resumen-estatal-pecuario/>. (Fecha de acceso: 13 de marzo de 2016).
- Sarikaya E. Higasa T. Adachi M. Mikami B. 2000. Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. *Process Biochemistry*, 35(7), 711-715.
- Sevillano L. Vijgenboom E. van Wezel GP. Díaz M. Santamaría RI. 2016. New approaches to achieve high level enzyme production in *Streptomyces lividans*. *Microbial Cell Factories*, 15, 1-10.
- Sharma A. Satyanarayana T. 2013. Structural and biochemical features of acidic α -amylase of *Bacillus acidicola*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61(0), 416-423.
- Shukla RJ. Singh SP. 2015. Characteristics and thermodynamics of α -amylase from thermophilic actinobacterium, *Laceyella sacchari* TSI-2. *Process Biochemistry*, 50(12), 2128-2136.
- Srivastava G. Singh VK. Kayastha AM. 2014. Identification of active site residues of Fenugreek β -amylase: Chemical modification and in silico approach. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83(0), 217-224.
- Theron L. Divol B. 2014. Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 98(21), 8853-8868.
- Torres OD. Velho L. 2009. La bioprospección como un mecanismo de cooperación internacional para fortalecimiento de capacidades en ciencia y tecnología en Colombia. *Ciência da Informação*, 38, 96-110.
- Tortora GJ. Funke BR. Case CL. 2013. *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires, Argentina. Panamericana.
- UNAD, Universidad Nacional Abierta y a Distancia (2016) Capitulo 8. Método de Análisis Sensorial. Escala hedónica. Disponible en:

http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401552/Capitulo_8/832escala_hednica.html.

(Fecha de acceso: 9 de agosto de 2016).

- Voet D. Voet JG. Pratt CW. Gismondi MI. 2007. Fundamentos de bioquímica la vida a nivel molecular. Buenos Aires, Argentina. Editorial médica Panamericana.
- Vullo D. 2003. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. Revista QuímicaViva, 2(3).
- Winn WC. Koneman EW. 2008. Koneman diagnóstico microbiológico : texto y atlas en color. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana.
- Yang W. He Y. Xu L. Zhang H. Yan Y. 2016. A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from *Burkholderia ubonensis* SL-4: Identification, characterization and application for biodiesel production. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 126, 76-89.
- Zhao J. Krishna V. Moudgil B. Koopman B. 2008. Evaluation of endospore purification methods applied to *Bacillus cereus*. Separation and Purification Technology, 61(3), 341-347.
- Ülker S. Karaoğlu ŞA. 2012. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. Journal of Bioscience and Bioengineering, 114(4), 385-390.