

Kéfir, fuente de enzimas hidrolasas y bacterias con potencial para degradar plásticos tipo pet

Kefir, source of hydrolase enzymes and bacteria with potential to degrade pet-type plastics

Jorge Rubio-Piña¹ ,
Silvia Tenorio-Salgado¹ ,
Samantha Peniche-Cartas¹ ,
Johan Ferraez-Balam¹ ,
Kristal Mis-Ruz¹ ,
Joaquín Zetina-Irizzont¹,
Víctor Manuel Moo-
Huchin¹ ,
Gerardo Rivera-Muñoz¹ ,
Sara Elena Solís-Pereira¹ ,
Gabriel Lizama-Uc^{1*} 

¹Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Mérida. Av. tecnológico, Plan de Ayala Norte KM 45.5 s/n. CP. 97118. Mérida, Yucatán, México.

*Autor de correspondencia: gabriel.lu@merida.tecnm.mx

Artículo científico

Recibido: 10 de febrero 2022

Aceptado: 10 de agosto 2022

Como citar: Rubio-Piña J, Tenorio-Salgado S, Peniche-Cartas S, Ferraez-Balam J, Mis-Ruz K, Zetina-Irizzont J, Moo-Huchim VM, Rivera-Muñoz G, Solís-Pereira SE, Lizama-Uc G (2022) Kéfir, fuente de enzimas hidrolasas y bacterias con potencial para degradar plásticos tipo pet. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 9(2): e3280. DOI: 10.19136/era.a9n2.3280

RESUMEN. El kéfir es un producto de leche fermentada que contiene una microbiota simbiótica que genera beneficios para la salud al sintetizar diferentes metabolitos y enzimas con diversas capacidades metabólicas. Por otra parte, los plásticos sintéticos utilizados en sectores del hogar e industrial, han originado un problema ambiental alrededor del mundo debido a su uso desmedido, su alta durabilidad y la falta de reciclado. Por tal motivo, el estudio de los consorcios de kéfir representa una fuente para la obtención de microorganismos productores de enzimas hidrolíticas capaces de degradar plásticos. En este estudio, se analizaron dos metagenomas de kéfir (NCBI proyecto PRJNA704713), mediante herramientas bioinformáticas, dirigidos a la búsqueda de secuencias homólogas a hidrolasas, así como el aislamiento de microorganismos relacionados con la degradación de plásticos tipo PET. Los resultados obtenidos permitieron la identificación de dos secuencias de kéfir homólogas a las enzimas dienolactona hidrolasa (DLH-1 y DLH-2) que han sido relacionadas con la degradación de compuestos plásticos. Ambas secuencias presentan un dominio compartido con la superfamilia alfa/beta hidrolasas; este tipo de motivo se ha observado en las PET hidrolasas obtenidas en diferentes especies de actinomicetos. Así mismo, se aislaron seis bacterias que mostraron diferentes características y capacidades para degradar plásticos PLC. En conclusión, los metagenomas del kéfir presentan secuencias de enzimas asociadas a la degradación de plásticos tipo PET y los microorganismos aislados del kéfir fueron capaces de degradar PLC, lo que sugiere que representan un potencial para la degradación de plásticos PET.

Palabras clave: PET, hidrolasas, kéfirs, consorcios microbianos.

ABSTRACT. Kefir is a fermented milk product that contains a symbiotic microbiota that generates health benefits by synthesizing different metabolites and enzymes with diverse metabolic capacities. For their part, synthetic plastics used in the home and industrial sectors have caused an environmental problem around the world due to excessive use, their high durability and lack of recycling. For this reason, Kefir consortia are studied as a source of hydrolytic enzymes and microorganisms capable of degrading plastics. For this, two kefir metagenomes (NCBI under the BioProject PRJNA704713) were analyzed, using bioinformatic tools, aimed at the search for sequences homologous to hydrolases, as well as the isolation of microorganisms that degrade PET-type plastics. The results obtained allowed the identification of two kefir sequences homologous to the diene lactone hydrolase enzyme (DLH-1 and DLH-2), which can participate in the degradation of plastic compounds. Both sequences presented a shared domain with the alpha/beta hydrolase superfamily; this type of motif has been observed in PET hydrolases obtained from different species of actinomycetes. Likewise, microorganisms with the capacity to degrade PLC plastics were isolated, suggesting that they possess enzymes with hydrolytic activity of industrial compounds for the manufacture of PET. In conclusion, our data demonstrate that kefirs are sources of hydrolytic enzymes of PET hydrolases and that it is possible to isolate PET-degrading microorganisms from them.

Key words: PET, hydrolases, kefirs, microbial consortia.

INTRODUCCIÓN

El kéfir es un producto de leche fermentada que tiene un ligero sabor ácido, carbonatación natural y aroma. El kéfir está constituido por una microbiota que reside de manera simbiótica en una matriz de polisacáridos y proteínas (Kesmen y Kacmaz 2011, Guzel-Zeydim *et al.* 2015). Existen evidencias de que el kéfir posee beneficios para la salud humana como incrementar la proliferación de linfocitos, la producción de inmunoglobulinas, la capacidad de digestión de la lactosa, reducir la hipertensión y el colesterol y también puede aumentar la absorción de calcio intestinal (Prado *et al.* 2015, Bourrie *et al.* 2016). También el kéfir posee actividad antimutagénica en diversos sistemas de células microbianas y de mamíferos e inhibe diferentes patógenos intestinales (Guzel-Zeydim *et al.* 2015, Bengoa *et al.* 2018). En este sentido, se sabe que el kéfir produce una diversidad de metabolitos como el ácido láctico y acético como productos principales, CO₂, etanol, acetato, acetona, además de antioxidantes y compuestos antiproliferativos. Al respecto, se ha observado que los beneficios en la salud están asociados con la diversidad microbiana y con los metabolitos que el consorcio produce (Chen *et al.* 2008).

Por otro lado, los plásticos sintéticos son utilizados en una amplia gama de sectores como el hogar, en la industria agrícola, marina y arquitectónica entre otras. Los polímeros de mayor importancia económica producidos son el poliuretano, polietileno, poliamidas, polietileno-tereftalato, poliestireno, polivinilcloruro y polipropileno (Shah *et al.* 2008). En muchas ocasiones estos plásticos han reemplazado el uso de vidrio y papel como materiales de empaque, debido a que se desarrollaron como materiales ligeros y duraderos (Bergmann *et al.* 2019). Pero el uso desmedido, alta toxicidad, durabilidad y la falta de reúso y reciclado, han originado un serio problema ambiental alrededor del mundo. Actualmente la producción de plásticos sintéticos oscila entre 350 y 400 millones de toneladas por año (Geyer *et al.* 2017) y se estima que pueden llegar a acumularse millones de toneladas tanto a nivel terrestre como marino. Por esta razón, diver-

sos estudios se han dirigido a la búsqueda de soluciones para eliminar o reducir el problema ambiental ocasionado por la acumulación de plásticos. Una alternativa es el tratamiento con luz UV y rompimiento mecánico, cuya acción genera partículas pequeñas, que al ser tratadas mediante un proceso de fotodegradación se modifican las propiedades químicas, físicas y mecánicas de los plásticos (Danso *et al.* 2019).

El tratamiento enzimático y/o microbiano para la degradación de plásticos representa una alternativa amigable con el medio ambiente. Se han identificado varias enzimas que degradan los polímeros plásticos como las hidrolasas de éster carboxílico (EC 3.1.1), la carboxilesterasa (EC 3.1.1.1), la triacilglicerol lipasa (EC 3.1.1.3) y las cutinasas (EC 3.1.1.74). Las enzimas más prometedoras son las polietileno-tereftalato hidrolasas (PET hidrolasas), que pertenecen al grupo de las cutinasas (Carr *et al.* 2020). Actualmente, se han descrito un número reducido de bacterias y hongos con capacidad de degradar parcialmente al PET en oligómeros y monómeros, lo cual ha sido asociado a la presencia de las enzimas PET hidrolasas. La mayoría de los aislamientos bacterianos con potencial de degradación de PET son miembros de las actinobacterias (Almedia *et al.* 2019).

Estudios previos de dos kéfirs provenientes de Campeche y Escárcega, mostraron que ambos consorcios presentan diferencias en la composición microbiana del gránulo, siendo la principal diferencia entre las especies pertenecientes a los géneros *Actinobacterias*, *Lactobacillus*, y *Saccharomyces* (Tenorio-Salgado *et al.* 2021). Además, mediante análisis bioinformático se observó que ambos consorcios producen diversos compuestos con actividad antimicrobiana y una amplia variedad de enzimas hidrolíticas que han sido relacionadas con la degradación de plásticos. Lo anterior abre una ventana de oportunidades para la búsqueda de secuencias homólogas a PET hidrolasas, así como el aislamiento de microorganismos degradadores de plásticos PET. Cabe mencionar que actualmente los estudios metagenómicos del kéfir están enfocados a la identificación de la microbiota que con-

forma al gránulo. Existen pocos estudios sobre el metabolismo de los organismos presentes en el kéfir y su aplicación biotecnológica y aún no se han encontrado reportes de la búsqueda de PET hidrolasas. Ambos consorcios están depositados en las bases de datos de la NCBI bajo el proyecto PRJNA704313. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo es estudiar a los consorcios de kéfir como fuente de enzimas hidrolíticas y microorganismos con potencial de ser utilizados en la degradación de plásticos tipo PET.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de los gránulos de Kéfir

La activación de los consorcios microbianos se realizó con 10 g de granos del consorcio que se lavaron con una solución isotónica. Después, se eliminó el agua de lavado, se inocularon en 1 000 mL de leche y se incubaron sin agitación por 48 h a 25 °C en una incubadora IKA KS 4000i. Estos cultivos se utilizaron para aislamiento de microorganismos.

Análisis de secuencias

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las PET hidrolasas se obtuvieron de bases de datos integradas en el NCBI y UniProt. Las secuencias se compararon con otras depositadas en las bases de datos de NCBI utilizando herramientas de alineación BLAST y de los metagenomas de los kéfirs de Campeche y Escárcega que previamente fueron depositadas en Sequence Read de la NCBI bajo el nombre de BioProject PRJNA704713. La búsqueda de secuencias de aminoácidos en los dos metagenomas se realizó por modelos ocultos de Markov (HMM) utilizando la página web HMMER. También se obtuvo la secuencia de las PET hidrolasas de *Ideonella sakaiensis* en Pfam con valores por default. El alineamiento mencionado anteriormente y el HMM se refinaron con los logotipos obtenidos por HMM utilizando la herramienta en línea Skyalign alineación.

Aislamiento y selección de microorganismos que degradan PCL

El aislamiento de bacterias ácido-lácticas se realizó en el medio de cultivo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (De Man *et al.* 1960). El aislamiento se llevó a cabo por la técnica de vaciado en placa, mediante la inoculación de 1 mL de gránulos de kéfir homogenizados a 15 mL del medio de cultivo fundido y enfriado a 45-50 °C. Posteriormente se mezcló por rotación, se dejó solidificar y las placas inoculadas fueron incubadas a 35 - 37 °C por 3 días ó a 30 °C hasta 5 días.

Para la selección de los microorganismos se prepararon placas con medio mínimo (MSM) que contenía (g L^{-1} : K_2HPO_4 0.5, KH_2PO_4 0.04, NaCl 0.1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 y FeSO_4 0.001, pH 7). También se preparó una suspensión de $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de PCL con densidad $1.146 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich / Merck en acetona precalentada a 50 °C y agitación continua. Se vertió la suspensión gota a gota sobre agua en agitación hasta formar una solución al 15% PCL. Después se mezcló 100 mL de la solución PCL a 25 °C por cada litro de medio MSM y agar 1.5%. Finalmente se adicionaron 25 mL del medio en placas de Petri. Una vez gelificado el agar se sembraron individualmente las bacterias por picadura y se incubaron a 37 °C por 7 días. Las colonias positivas se identificaron mediante un halo transparente en el medio ligeramente turbio.

Caracterización de los microorganismos seleccionados

Para la caracterización morfológica se empleó un microscopio óptico marca Labomex con objetivo de 100x. La tinción diferencial de Gram se realizó usando el protocolo de la casa comercial HYCEL. La actividad de catalasa se determinó depositando 100 μL de un cultivo de 24 h de cada colonia sobre un porta objetos. Se añadió a cada muestra 50 μL de peróxido de hidrógeno al 30%, la aparición de burbujas se consideró un resultado positivo. Las pruebas de movilidad se llevaron a cabo en tubos de ensayo con medio LB sólido. Los medios fueron inoculados con la muestra de cada colonia tomada con un asa en hilo y se sembró en un tubo recto. Finalmente

los tubos fueron incubados por 24 h a 37 °C. La velocidad específica de crecimiento (μ), se determinó a partir de la curvas de crecimiento obtenidas para cada microorganismo aislado.

RESULTADOS

El análisis de los metagenomas de los consorcios de kéfirs de Escárcega y Campeche permitió la identificación de dos secuencias homólogas a las hidrolasas DLH-1 y DLH-2. La secuencia de la DLH-1 contiene un marco de lectura abierto de 831 pb que corresponde a 276 aminoácidos, con una masa predicha de 29.13 kDa y pl de 5.45. Por otro lado, la DLH-2 tiene un marco de lectura de 687 pb que corresponde a un péptido de 228 aminoácidos, con una masa molecular predicha de 24.38 kDa y pl 5.88. Las secuencias de aminoácidos deducidos de la DLH-1 y DLH-2 mostraron un 57% de posiciones similares y un 15% de identidad entre ellas (Figura 1).

La comparación de las secuencias de aminoácidos deducidos de la DLH-1 y DLH-2 con las secuencias depositadas en el GenBank y UniProt utilizando el programa BLAST, mostró un 82 y 64% de identidad respectivamente con la enzima dienolactona hidrolasa (DLH; EC: 3.1.1.45), que se ha relacionado con la degradación de compuestos aromáticos tales como clorociclohexano, clorobenceno, fluoro-benzoato y tolueno.

En particular, la DLH-1 presentó 154 aminoácidos conservados con el motivo DLH del género *Gordonia* sp., una bacteria grampositiva de la clase Actinobacteria (Figura 2A), mientras que en la DLH-2 se observó un dominio de 193 aminoácidos presente en diferentes especies, principalmente en las bacterias grampositivas del género *Micromonospora* sp. (Figura 2B). Cabe mencionar que estos géneros fueron detectados en el metagenoma de los dos kéfirs. El análisis de las porciones centrales del dominio de la DLH-1 y DLH-2, incluyen los aminoácidos 29 - 153 y 30 - 223, respectivamente (Figura 3). De igual forma, en ambas secuencias se observó un dominio compartido con la superfamilia alfa/beta

hidrolasas (8 - 267 y 11 - 223 para la DLH-1 y DLH-2, respectivamente) el cual puede actuar como un catalizador bioquímico. Este tipo de motivo es común a varias enzimas que catalizan la hidrólisis de una variedad de polímeros plásticos.

El análisis filogenético (Figura 4) mostró una relación de cada una de las DLH con diferentes grupos de especies bacterianas. La agrupación de dichas secuencias en dos clados, sugiere que la DLH-1 se encuentra más cercana al género *Gordonia* y la DLH-2 a los géneros *Phytohabitans* y *Micromonospora* y también sugiere que se encuentran entre las familias estructurales más grandes de proteínas (alfa/beta-hidrolasas) conocidas en la naturaleza, aunque varían en su secuencia y posible función. Se sabe que estas enzimas utilizan un mecanismo catalítico de nucleófilo ácido-base similar para catalizar reacciones en diferentes sustratos.

A partir los gránulos de kéfir de Escárcega y Campeche se obtuvieron 50 aislados bacterianos, los cuales fueron inoculados en placas con medio mínimo y PCL como única fuente de carbono. Se seleccionaron 6 colonias que formaron un halo translúcido en el medio de cultivo y fueron nombradas JS1 a JS6 (Figura 5). Las bacterias mostraron algunas diferencias morfológicas y bioquímicas como la forma de la colonia, la movilidad, la velocidad de crecimiento y su capacidad para hidrolizar PLC (Tabla 1).

DISCUSIÓN

Los polímeros termoplásticos son materiales ampliamente utilizados debido a sus propiedades fisicoquímicas (Andrady y Neal 2009). De estos polímeros, los derivados del petróleo como polietileno (PE), poliuretano (PU), poliestireno (PS), polipropileno (PP), policloruro de vinilo (PVC), polietileno tereftalato (PET) se han usado extensivamente en la industria y en aplicaciones domésticas. Es importante señalar que estos polímeros son extremadamente difíciles de biodegradar (Mohanan et al. 2020). Los procesos de reciclado químico de PET incluyen la metanólisis, glicólisis, hidrólisis, amonólisis, y aminólisis (Al-Sabag et al. 2016). También se han aislado microorganismos con la capacidad de

DLH-1	1	-----MAD--DPLDDFDAEDVTLYGTTTRRVHRLGSGPAVIVIAEMPG---I	41
DLH-2	1	MTWTRRRWRHDCIMDEVRIIPVGDGAQLGATIDGPPD-----PRGVVLFAGHSGSSRR	53
		* : ** * ..* :	* : * : *
DLH-1	42	SPKVADVARRVAGAGAPAVLPSLFGVAGRPRPDHLGAVGSATNMLGTIARACVTFREF--	99
DLH-2	54	SPRNRMVAERLNRSYTTVLLDLLTAAEAAA-----DELTAEWRF	93
		** : ** * : * : ** * : *	: * * :
DLH-1	100	TIL-ATGKTSFVASWLRALAAREHDCRGPGVGVGMCFTGGFALAMA-TDERMLAPVL-	156
DLH-2	94	DIGVLSRLVAADWLVPR-----GLPLGLFGASTGAAAALVAAERPKHIQAVVS	144
		* : : . ** *	* : * . . . ** * : : * :
DLH-1	157	-----SQPSLFFAVLPGRARAI-D-VSESDLALVQARCARGLEVMGLRFQGR	202
DLH-2	145	RGGRPDLAGRALKRVSVPTLLIVGGEDEVVSGLNESPA-----EVLA-EHAEIV	192
		: * * : * : . : * **	** : . .
DLH-1	203	LVPGARFAYLREILGDAFIGIELPDESANPDSMLPRPHSVLTEDLRDEPGQPTREAYDRV	262
DLH-2	193	IVPGASHLF-----TEPGTLERVA-ELA	214
		: * * * . :	* * * * * : .
DLH-1	263	IDFFTAKLGLQPTI	276
DLH-2	215	AEWFDTHLRSPAPA	228
		: * : * :	

Figura 1. Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidos a partir de DLH-1 y DLH-2 obtenidas de kefir de leche de Escárcega y Campeche. Las marcas señalan posiciones similares e idénticas.

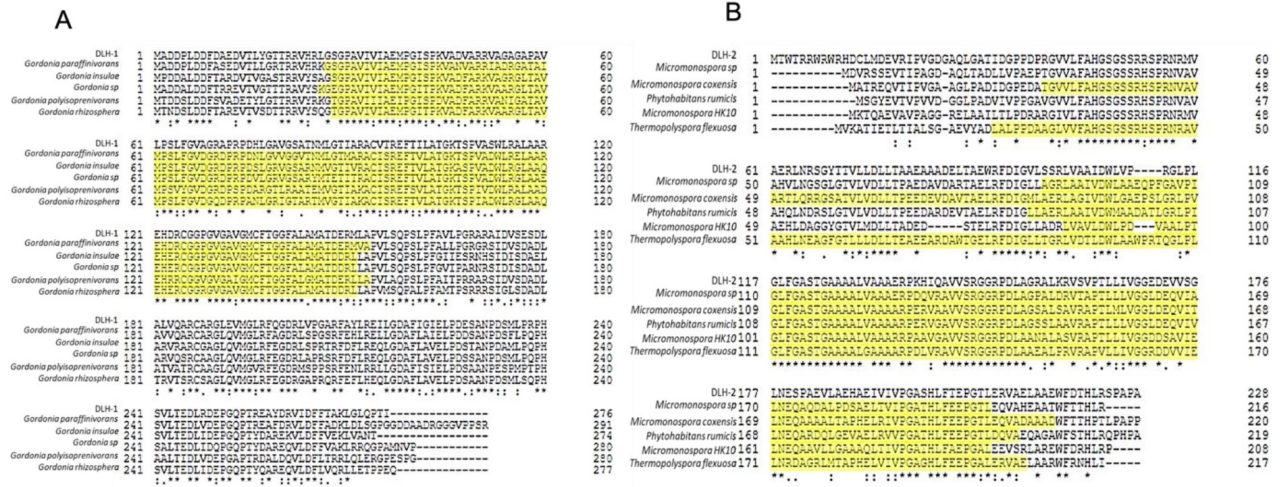


Figura 2. Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidos de la DLH-1 y DLH-2 con secuencias reportadas para las hidrolasas de dieno-lactona (DLH) en diferentes especies. A: DLH-1 El recuadro amarillo indica la secuencia consenso del motivo DLH. Accesoión UniProt: M3UWJ3; A0A3G8JII0; A0A6L7GT85; H6MV81; K6W3W2. B: DLH-2 El recuadro amarillo indica la secuencia consenso del motivo DLH. Accesoión UniProt: A0A4Q7ZXM9; A0A1C5J1V7; A0A0M2RXQ6; A0A6V8L2N5; A0A543J1J3.

degradar este tipo de materiales en condiciones *in vitro*, siendo una alternativa para la hidrólisis del PET mediante las reacciones biológicas mediadas por enzimas bajo condiciones controladas. Las enzimas involucradas en este proceso son las cutinasas, lipasas, esterazas y carboxilesterasas aisladas, principalmente, de hongos y bacterias (Koshty *et al.* 2018,

Wei *et al.* 2014).

Anteriormente se pensó que la degradación de PET estaba limitada a unos pocos grupos bacterianos, sin embargo, la mayoría de los aislados bacterianos con potencial de degradación de PET, son miembros del phylum Actinobacteria; siendo *Thermobifida* y *Thermomonospora* los géneros mejor

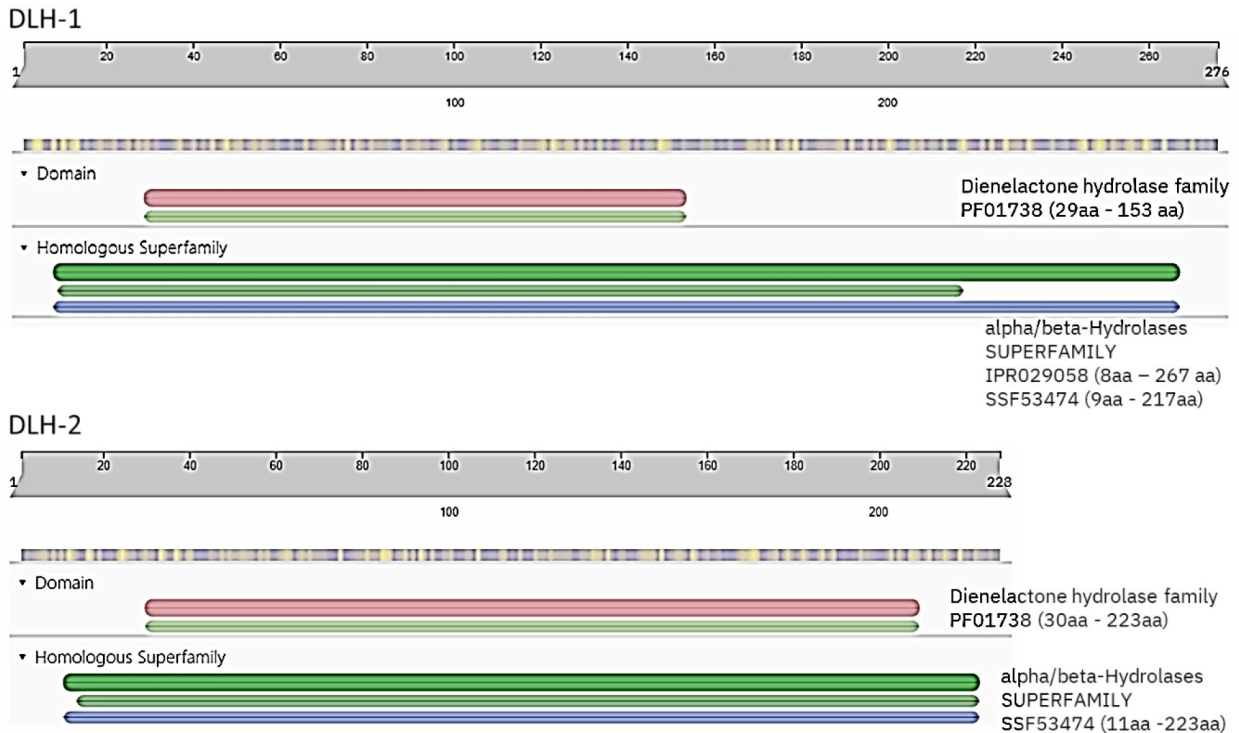


Figura 3. Comparación de los motivos asociados a la secuencia de aminoácidos deducidos DLH-1 y DLH-2 de kéfir de leche. La barra gris representa los aminoácidos de cada secuencia completa. Las barras de colores indican los motivos identificados, posiciones y accesión UniProt.

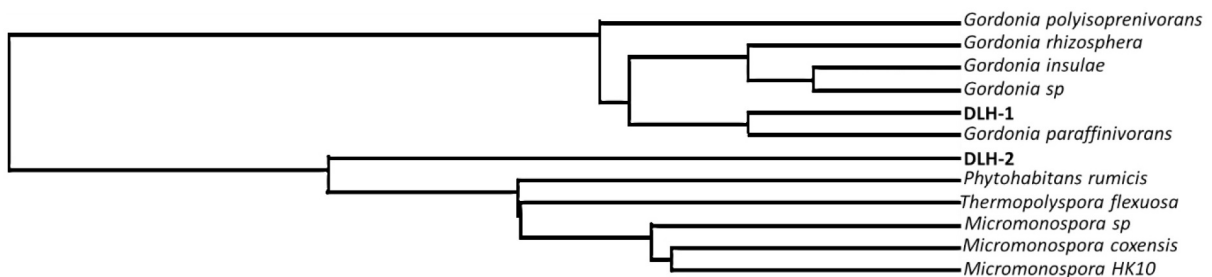


Figura 4. Árbol filogenético obtenido mediante la aplicación del método neighbor-joining (método del vecino más próximo) utilizando la secuencia de nucleótidos codificantes de la DLH-1 y DLH-2, y proteínas relacionadas. Accesión UniProt: A0A4Q7ZXM9; A0A1C5J1V7; A0A0M2RXQ6; A0A6V8L2N5; A0A543J1J3; M3UWJ3; A0A3G8JII0; A0A6L7GT85; H6MV81; K6W3W2.

caracterizados para este proceso (Gamerith *et al.* 2017). Después se aisló la bacteria gram negativa *Ideonella sakaiensis* cepa 201-F6 que puede utilizar el PET como fuente de energía y carbono. Esta bacteria actúa mediante la enzima PET hidrolasa produciendo monómeros no tóxicos como el ácido tereftálico y el etilenglicol. Las enzimas tipo PET hidrolasa contienen un dominio denominado dieno-lactona hidrolasa (DLH), que es un dominio genérico 102 α/β hidrolasa, presente en algunas hidrolasas

(Danso *et al.* 2018).

En el presente trabajo se identificaron secuencias con el dominio DHL y se ha demostrado que estas secuencias son homólogas a genes que codifican enzimas involucradas en la degradación de PET (Intikhab *et al.* 2020). Además, los análisis filogenéticos demostraron que las secuencias detectadas en los metagenomas de kéfirs están agrupadas en los clados con los géneros de *Gordonia* y *Micromonosporas* que fueron detectados previa-

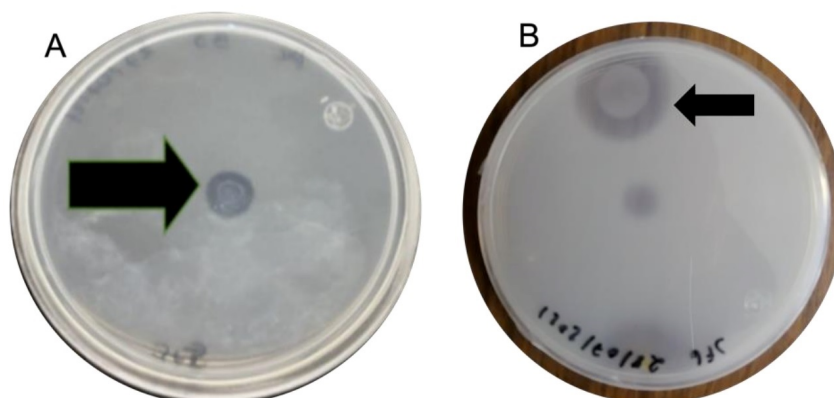


Figura 5. Imagen representativa de las colonias aisladas del kéfir con actividad para degradar PCL al 15%. A: colonia JS 4; B: colonia JS6. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 7 días, las flechas indican el halo de hidrólisis.

Tabla 1. Características de las cepas aisladas.

Cepa	Tinción Gram	Morfología	Catalasa	Movilidad	Velocidad específica de crecimiento (μ)
JS 1	Positiva	Bacilo	Positivo	Si	0.382
JS 2	Negativa	Estafilococos	Positivo	SI	0.435
JS 3	Negativa	Bacilo	Positivo	SI	0.360
JS 4	Negativa	Bacilo	Positivo	NO	0.482
JS 5	Negativa	Cocos	Positivo	SI	0.412
JS 6	Negativa	Cocos	Positivo	SI	0.921

mente en los metagenomas de los kéfirs de Escárcega y Campeche (Salgado-Tenorio *et al.* 2021). Asimismo, se ha demostrado que tanto el género *Gordonia* como *Micromonospora* pueden asimilar y consumir hidrocarburos alifáticos (Silva *et al.* 2019).

Por otro lado, el kéfir es un producto lácteo con características probióticas, está conformado por una microbiota embebida en una matriz de polisacárido y proteínas. En el gránulo conviven en actividad simbiótica bacterias ácido-lácticas, bacterias ácido-acéticas y levaduras, empleando como cementante al kefirano. Este polisacárido extracelular secretado por la microbiota del kéfir contiene muchos grupos hidroxilo y es soluble en agua (Bengoa *et al.* 2019). Debido a la estructura conformacional del kéfir es necesaria la secreción de enzimas hidrolíticas por parte de los consorcios para la degradación de las matrices de polisacáridos. El kéfir ha sido fuente para el aislamiento de microorganismos para diversas aplicaciones, en especial, el aislamiento de bacterias ácido-lácticas (Zanirati *et al.* 2015, Hurtado *et al.* 2021), sin embargo, aún no ha sido utilizado para el aislamiento de microorganismos degradadores de

polímeros. La degradación de plásticos PET ha sido reportada en microorganismos de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Idonella*, *Acanthopleurobacter*, *Phanerochacte*, *Thermonospora*, *Thermobifida* entre otros (Mohanani *et al.* 2020) y algunos de estos géneros fueron detectados en los metagenomas de los kéfirs empleados en este trabajo (Tenorio-Salgado *et al.* 2021).

Para el aislamiento de microorganismos a partir del kéfir, se empleó la policaprolactona (PCL) que es un plástico biosintético biodegradable sintetizado a partir de ϵ -caprolactona (Oda *et al.* 2006). Debido a que la PCL contiene enlaces tipo éster similares a los encontrados en el PET, se utilizó como indicador en la búsqueda de microorganismos degradadores de PCL. Por otra parte, los microorganismos capaces de degradar PCL también pueden tener la capacidad de degradar PET como ha sido demostrado en *Streptomyces* sp. SM14 (Almeida *et al.* 2019). De las 50 cepas aisladas solo 6 lograron degradar la PCL y fueron nombradas JS1-JS6. La variación en la eficiencia de las cepas para degradar el polímero, aunado a las diferencias en sus características mor-

fológicas y bioquímicas sugieren que las cepas son diferentes, sin embargo, será necesario realizar análisis moleculares para la identificación de los microorganismos aislados.

Se ha reportado que la degradación del PCL puede ocurrir por vía enzimática, mediante la acción de enzimas lipasas, cutinasas y carboxilesterasas (Bartnikowski *et al.* 2019). Estas enzimas se caracterizan por tener un dominio de α/β hidrolasa y una tríada catalítica que consiste en un residuo de aspartato (Asp) o glutamato (Glu), una histidina (His) y un residuo nucleofílico de serina (Ser) (De Simone *et al.* 2001). Por otra parte, se ha demostrado que la digestión mediada por enzimas PET hidrolasas convierten al PET en mono(2-hidroxietil) ácido tereftálico (MHET), con mínimas cantidades de ácido tereftálico (TPA) y bis(2-hidroxietil)-TPA como productos secundarios. Otra enzima, la MHETase (MHET-enzima digestora), hidroliza al MHET produciendo dos monómeros el TPA y EG (etilenglicol) (Yoshida *et al.* 2016) y posteriormente durante el metabolismo del EG y derivados, se producen el glioxal, glicolato y glioxilato, los cuales tienen diversas aplicaciones. Lo anterior resalta la importancia de los microorganismos provenientes del kéfir que producen enzimas involucradas en la degradación de plásticos y que contribuirían no sólo a la reducción del problema ambiental, sino también representan una

fuentes de compuestos de interés biotecnológico.

CONCLUSIONES

El análisis bioinformático de los metagenomas de kéfirs, permitieron identificar dos secuencias homólogas a hidrolasas que han demostrado estar involucradas en la degradación de compuestos aromáticos como el PET. Estas secuencias denominadas DLH-1 y DLH-2 presentan homología del 82 y 65% con la enzima PET dieno lactona hidrolasa, respectivamente. También se aislaron 6 bacterias denominadas JS1-JS6 que hidrolizaron el PCL *in vitro*, por lo que este trabajo es el primero en demostrar que los kéfirs de Escárcega y Campeche pueden ser una fuente microorganismos productores de enzimas relacionadas con la degradación de plásticos como los tipo PET. Adicionalmente a los beneficios atribuidos al kéfir, los consorcios del kéfir muestran un gran potencial biotecnológico, lo que abre una ventana para explorar kéfirs de diferentes puntos del país.

AGRADECIMIENTOS

Al Tecnológico Nacional de México por el apoyo al proyecto con número de registro: 19rk18 (7743), 2020-09-21 10:33:31 (Z:CDMX).

LITERATURA CITADA

- Almeida EL, Carrillo Rincón AF, Jackson SA, Dobson ADW (2019) In silico screening and heterologous expression of a polyethylene terephthalate hydrolase (PETase)-Like Enzyme (SM14est) with polycaprolactone (PCL) degrading activity, from the marine sponge-derived strain *Streptomyces* sp. SM14. *Frontiers in Microbiology* 10: 2187. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02187.
- Al-Sabagh AM, Yehia FZ, Eshaq G, Rabie AM, ElMetwally AE (2016) Greener routes for recycling of polyethylene terephthalate. *Egyptian Journal of Petroleum* 25: 53-64.
- Andrady AL, Neal MA (2009) Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 364: 1977-1984.
- Bartnikowski M, Dargaville TR, Ivanovski S, Hutmacher DW (2019) Degradation mechanisms of polycaprolactone in the context of chemistry, geometry and environment. *Progress in Polymer Science* 96: 1-20. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2019.
- Bengoa CAA, Iraporda GL, Garrote AG, Abraham (2019) Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *Journal of Applied Microbiology* 126: 686-700.

- Bergmann M, Mützel S, Primpke S, Tekman M.B., Trachsel J, Gerdtts, G (2019) White and wonderful? microplastics prevail in snow from the alps to the artic. *Science Advances* 5: eaax1157. DOI: 10.1126/sciadv.aax1157
- Bourrie BC, Willing BP, Cotter PD (2016) The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. *Frontiers in Microbiology* 7: 647. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00647.
- Carr CM, Clarke DJ, Dobson ADW (2020) Microbial polyethylene terephthalate hydrolases: current and future perspectives. *Frontiers in Microbiology* 11. DOI: 10.3389/fmicb.2020.571265.
- Chen HC, Wang SY, Chen MJ (2008) Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology* 25: 492-501.
- Danso D, Chow J, Streit WR (2019) Plastics: microbial degradation, environmental and biotechnological perspectives. *Applied and Environmental Microbiology* 85: e01095-19. DOI: 10.1128/aem.01095-19.
- De Simone, Menchise V, Manco G, Mandrich L, Sorrentino N, Lang D, Rossi M, Pedone C (2001) The crystal structure of a hyper-thermophilic carboxylesterase from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*1. *Journal Molecular Biology* 314: 507-518.
- De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology* 23: 130-135.
- Gamerith C, Vastano M, Ghorbanpour SM, Zitzenbacher S, Ribitsch D, Zumstein MT, Guebitz GM (2017) Enzymatic degradation of aromatic and aliphatic polyesters by *P. pastoris* expressed cutinase 1 from *Thermobifida cellulolytica*. *Frontiers in Microbiology* 8: 938. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00938.
- Geyer R, Jambeck JR, Law KL (2017) Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances* 3: e1700782. DOI: 10.1126/sciadv.1700782.
- Guzel-Seydim ZB, Kok-Tas T, Greene AK, Seydim AC (2011) Review: Functional properties of kefir. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 51: 261-268.
- Hurtado-Romero A, Del Toro-Barbosa M, Gradilla-Hernández MS, Garcia-Amezquita LE, García-Cayuela T (2021) Probiotic properties, prebiotic fermentability, and GABA-producing capacity of microorganisms isolated from mexican milk kefir grains: A clustering evaluation for functional dairy food applications. *Foods* 10: 2275. DOI: 10.3390/foods10102275.
- Intikhab A, Nojood A, Martin C, Kamau A, Guzmán-Vega FJ, Jamil T, Momin AA, Acinas SG, Gasol JM, Arold ST, Gojobori T, Agusti S, Duarte CM (2020) Rapid evolution of plastic-degrading enzymes prevalent in the global ocean. *bioRxiv* 285692. DOI: 10.1101/2020.09.07.285692.
- Kesmen Z, Kacmaz N (2011) Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture-independent methods. *Journal of Food Science* 76: M276-M283. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02191.x.
- Koshti R, Mehta L, Samarth N (2018). Biological recycling of polyethylene terephthalate: A mini-review. *Journal of Polymers and the Environment* 26: 3520-3529.
- Mohan N, Montazer Z, Sharma PK, Levin DB (2020) Microbial and enzymatic degradation of synthetic plastics. *Frontiers in Microbiology* 68: 2171-2177.
- Oda Y, Oida N, Urakami T, Tonomura K (2006) Polycaprolactone depolymerase produced by the bacterium *Alcaligenes faecalis*. *FEMS Microbiology Letters* 152: 339-343.
- Prado MR, Blandón LM, Vandenberghe LP, Rodrigues C, Castro GR, Thomaz-Soccol V, Soccol CR (2015) Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology* 6: 1177. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01177.

- Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S (2008) Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology Advances* 26: 246-265.
- Silva NM, de Oliveira AMSA, Pegorin S, Giusti CE, Ferrari VB, Barbosa D, Martins LF, Morais C, Setubal JC, Vasconcellos SP, da Silva AM, de Oliveira JCF, Pascon RC, Viana-Niero C (2019) Characterization of novel hydrocarbon-degrading *Gordonia paraffinivorans* and *Gordonia sihwensis* strains isolated from composting. *PLoS One* 14: e0215396. DOI: 10.1371/journal.pone.0215396.
- Tenorio-Salgado S, Castelán-Sánchez HG, Dávila-Ramos S, Huerta-Saquero A, Rodríguez-Morales S, Merino-Pérez E, Roa de la Fuente LF, Solis-Pereira SE, Pérez-Rueda E, Lizama-Uc G (2021) Metagenomic analysis and antimicrobial activity of two fermented milk kefir samples. *Microbiology Open* 10: e1183. DOI: 10.1002/mbo3.1183.
- Wei R, Oeser T, Zimmermann W (2014) Synthetic polyester-hydrolyzing enzymes from thermophilic actinomycetes. *Advances in Applied Microbiology* 89: 267-305.
- Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, Taniguchi I, Yamaji H, Maeda Y, Toyohara K, Miyamoto K, Kimura Y, Oda K (2016) A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*. 351: 1196-1199.
- Zanirati DF, Abatemarco M Jr, Sandes SHC, Nicoli JR, Nunes AC, Neumann E (2015) Selection of lactic acid bacteria from brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe* 32: 70-76.