



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**INMOVILIZACIÓN DE ESTERASAS A PARTIR DE UN
EXTRACTO CRUDO DE Aspergillus nidulans PW1**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

LQA ANA MARÍA DEL PILAR VERGARA BARROSO



TUTOR: Dra. Amelia Farrés González-Saravia

AÑO: 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente: Dr. Héctor Guillermo Barrios López

Vocal: Dra. María del Carmen Wachter Rodarte

Vocal: Dr. José Mariano García Garibay

Vocal: Dr. Enrique García Hernández

Secretario: Dr. Arturo Navarro Ocaña

El trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto "E" de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor:

Dra. Amelia Farrés González-Saravia

Sustentante:

LQA Ana María del Pilar Vergara Barroso

El trabajo de investigación se presentó en los siguientes eventos bajo la modalidad de cartel:

- ✂ “Inmovilización de esterasas a partir de un extracto crudo de *Aspergillus nidulans* PW1”, QuimiUNAM 2009, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, Noviembre 2009, México DF.

- ✂ “Inmovilización de una proteasa termoestable y alcalina (PrtA) de *Aspergillus nidulans*”, XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C., Junio 2009, Acapulco Gro.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a su programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca N.º. 211336 otorgada durante mis estudios de Maestría.

A la Coordinación de Estudios de Posgrado por la beca otorgada del Programa de Fomento a la Graduación de los alumnos de Posgrado de la UNAM.

Al financiamiento del proyecto PAPIIT IN2148092 otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT).

A la Dra. Amelia Farrés por la oportunidad que me brindó de trabajar bajo su dirección y su incondicional apoyo.

A la Dra. Carolina Peña y M. en C. Denise Castro por su asesoría técnica, por compartirme sus conocimientos y su apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Arturo Navarro O. por su asesoría y materiales brindados para la realización de las reacciones de hidrólisis.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y a sus acertados comentarios.

A mis papás Pilar y David por su ejemplo de fortaleza y perseverancia, su gran amor, su generosidad, por siempre buscar darnos lo mejor y su apoyo incondicional.

A mi hermano David por tu cariño, tu apoyo y tu cuidado.

A mi familia por su apoyo y sus porras. Pero muy especial a mi abuelita Mema[†] por el gran ejemplo que fue, su amor incondicional, su apoyo y su contagiosa alegría.

A Adriana, Durda y Carmelita por su amistad, su apoyo, su tiempo para escucharme y por estar a mi lado después de tantos años de conocernos.

A Ale, Taka y Andrea, amigos inigualables que me han escuchado, apoyado, regañado y acompañado en inolvidables momentos tantos buenos como no tan buenos.

A Lucía por tu apoyo y tus consejos.

A Israel García Cano (pasante de doctorado), un especial agradecimiento, por tu asesoría, por tenerme la paciencia de contestar a todas mis preguntas y tu apoyo a lo largo del desarrollo del proyecto. Por tu gran amistad, tus consejos y tus regaños que muchas veces sí que los necesité.

A mis compañeros del laboratorio 312: Mirna y Carlos G., gracias por compartirme sus conocimientos; Liliana, Blanquita, Serch, Ruth, Carlos M., Ale, Zaine, por su amistad, su apoyo y momentos inolvidables que compartimos.

A mis amigos de la maestría: Edith, Carmen, Cora, Héctor, Omar, Ivann, Elba, More y Moy, por su apoyo y su amistad.

“In the middle of difficulty lies opportunity”

Albert Einstein



Índice General

Resumen	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	
2.1. Biocatálisis	5
A. Hidrolasas	8
B. Aplicación e importancia económica de las hidrolasas	17
2.2. Inmovilización	21
A. Métodos de inmovilización de enzimas	22
2.3. <i>Apergillus nidulans</i>	32
3. Hipótesis	34
4. Objetivos	
4.1. Objetivo general	35
4.2. Objetivos particulares	35
5. Desarrollo experimental	
5.1. Reactivos	36
5.2. Métodos	38
A. Microorganismo y conservación	38
B. Medio de cultivo y activación de la cepa	38
C. Producción de la enzima	41
D. Métodos de determinación de actividad enzimática y proteína	42
E. Acondicionamiento de la muestra	43
F. Evaluación del perfil de proteína y zimogramas	44
G. Inmovilización	46
H. Caracterización de la enzima inmovilizada y el extracto crudo	49
I. Biotransformación del ácido kójico	52

6. Resultados y Discusión	
6.1. Producción de la enzima	54
6.2. Inmovilización	56
A. Determinación de las condiciones de inmovilización	56
B. Caracterización de la enzima inmovilizada y el extracto crudo	63
6.3. Biotransformación del ácido kójico	69
7. Conclusiones	72
8. Perspectivas	73
9. Bibliografía	74
10. Apéndice	83

Índice de Figuras

Fig. 1 Mecanismo de catálisis	5
Fig. 2 Hidrólisis de triacilglicerolos por lipasas	9
Fig. 3 Reacción de hidrólisis del enlace éster	11
Fig. 4 Reacción de hidrólisis de la cutina	12
Fig. 5 Plegamiento canónico de las hidrolasas α/β	14
Fig. 6 Mecanismo de hidrólisis de las hidrolasas α/β en el sitio activo	16
Fig. 7 Estructura del ácido kójico	19
Fig. 8 Métodos de inmovilización	22
Fig. 9 Inmovilización por enlace covalente	23
Fig.10 Inmovilización por entrecruzamiento	24
Fig. 11 Inmovilización por retención	26
Fig. 12 Inmovilización por encapsulación	27
Fig. 13 Accurel MP 1000	30
Fig. 14 Reacciones de hidrólisis de los <i>p</i> -nitrofenil ésteres utilizados como sustrato para la determinación de la especificidad por sustrato	51
Fig. 15 Evaluación del perfil de proteínas del extracto crudo de <i>A. nidulans</i> PW1 en medio optimizado con sacarosa. SDS-PAGE (12 %) teñido con azul de Coomassie y zimograma	55
Fig. 16 Adsorción de las esterasas de <i>A. nidulans</i> en Accurel MP – 1000	58
Fig. 17 Evaluación del perfil de proteínas durante el proceso de inmovilización	60
Fig. 18 Adsorción de las esterasas de <i>A. nidulans</i> PW1 utilizando diferentes concentraciones iniciales de proteína	61

Fig. 19 Termoestabilidad de las enzimas en solución y de las enzimas inmovilizadas después de 1 h de incubación	63
Fig. 20 Efecto del pH en la estabilidad de las enzimas sin inmovilizar y de las enzimas inmovilizadas, después de 24 h de incubación a 4°C	64
Fig. 21 Efecto del pH en la actividad de las enzimas en solución y de las enzimas inmovilizadas de <i>A. nidulans</i> PW1	65
Fig. 22 Efecto de la temperatura en la actividad del extracto y de las enzimas inmovilizadas de <i>A. nidulans</i> PW1	66
Fig. 23 Actividad de las enzimas solubles e inmovilizadas sobre ésteres de <i>p</i> -nitrofenilo con diferentes largos de cadena	67
Fig. 24 Evaluación de la reacción de hidrólisis del dilaurato de ácido kójico por CCF	69
Fig. 25 Dilaurato de ácido kójico	70
Fig. 26 Monolaurato de ácido kójico	71

Índice de Tablas

Tabla 1. Ventajas y desventajas del uso de enzimas en síntesis orgánica	6
Tabla 2. Aplicaciones industriales de esterasas, lipasas y cutinasas microbianas	17
Tabla 3. Características físicas del Accurel MP 1000	31
Tabla 4. Secuencias de carboxilesterasas encontradas en el genoma de <i>A. nidulans</i>	33
Tabla 5. Reactivos y marcas	36
Tabla 6. Composición del medio mínimo para el crecimiento de <i>A. nidulans</i> PW1	38
Tabla 7. Composición de la disolución de sales 20 x	39
Tabla 8. Composición de la disolución de elementos traza 100 x	39
Tabla 9. Requerimientos nutricionales de <i>A. nidulans</i> PW1	40
Tabla 10. Composición final del medio optimizado con sacarosa para el crecimiento de <i>A. nidulans</i> PW1	41
Tabla 11. Actividad de esterasa después de inmovilizar a diferentes valores de pH y temperatura	56
Tabla 12. Actividad residual y concentración de proteína libre en sobrenadante	58
Tabla 13. Parámetros determinados para la adsorción de las esterasas de <i>A. nidulans</i> PW1 a partir de un extracto crudo sobre Accurel MP – 1000	62

Abreviaturas

BSA	Seroalbúmina bovina
C	Carbono
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CDCl_3	Cloroformo deuterado
CLE	Cross link enzymes
CLEA	Cross link enzyme aggregates
CLEC	Cross link enzyme crystals
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EC	Enzyme Commission
f.m.	Fase móvil
ΔG°	Energía libre de Gibbs
H	Hora
Hz	Hertz
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
J	Constante de acoplamiento
MHz	Mega hertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -nitrofenol
<i>p</i> -NPA	<i>p</i> -nitrofenil acetato
<i>p</i> -NPE	<i>p</i> -nitrofenil estearato

p -NPL	p -nitrofenil laurato
p -NPM	p -nitrofenil miristato
p -NPP	p -nitrofenil palmitato
ppm	Partes por millón
PPO	Polifenol oxidasa
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
rpm	Revoluciones por minuto
s	Simple
SDS-PAGE	Electroforésis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
t	Triple
UV	Ultra violeta
δ	Desplazamiento químico (ppm)
μ	Micra

La búsqueda de sistemas que permitan una mayor estabilidad de las enzimas, resulta relevante para su aplicación a nivel industrial. La inmovilización de enzimas lipolíticas en superficies hidrofóbicas representa una alternativa para la obtención de un biocatalizador estable con capacidad para ser empleado en presencia de disolventes orgánicos, y de esta forma poder llevar a cabo reacciones de hidrólisis sobre sustratos con potencial biológico que resulten interesantes para su aplicación en diferentes áreas, como alimentos y/o farmacia.

El objetivo de este trabajo fue la producción de esterasas de la cepa de *Aspergillus nidulans* PW1 en un medio optimizado con sacarosa para llevar a cabo su inmovilización por adsorción y evaluar su uso en reacciones de hidrólisis. Se utilizó el soporte Accurel MP 1000, en el cual se establecen interacciones hidrofóbicas. También se realizó la caracterización de las enzimas en el extracto y de la enzima inmovilizada. Finalmente, se evaluó la capacidad para llevar a cabo la hidrólisis selectiva de un enlace éster del dilaurato de ácido fólico el cual es un sustrato con potencial antioxidante.

Se evaluaron las variables de concentración de proteína, pH, temperatura y tiempo de adsorción para lograr la máxima actividad en el catalizador y se encontró que las condiciones ideales para la inmovilización de las esterasas a partir de un extracto crudo de *A. nidulans* PW1 sobre Accurel MP 1000 fueron: 0.2 mg/mL de proteína inicial, pH 7.0, fuerza iónica 50 mM, 4°C, 200 rpm y 3 h de inmovilización.

La enzima inmovilizada presentó estabilidad en un amplio rango de valores de pH (5 – 10) ya que no se observó disminución de la actividad después de 24 h de incubación. La enzima inmovilizada conservó el 80% de actividad después de 1 h de incubación a 60°C. La actividad óptima del extracto crudo se presentó a 30°C y pH 8.0, mientras que de la enzima inmovilizada fue a 30°C y pH 9.0. Se presentó especificidad por sustratos de cadena larga, lo cual corresponde con el hecho de que las esterasas que se producen en las condiciones de cultivo empleadas son principalmente de tipo cutinasa.

La enzima inmovilizada llevó a cabo la hidrólisis selectiva de la posición C-5 del dilaurato del ácido kojico lo que permitió la recuperación de la actividad antioxidante de esta molécula. Además, se mantuvo un balance hidrofóbico/hidrofílico de la molécula por la esterificación de la posición C-7 por una molécula de laurato.

1. Introducción

Las enzimas son moléculas, que tienen la función de catalizar todas las reacciones del metabolismo celular para preservar la integridad de los sistemas biológicos (Wiseman, 1985); como cualquier catalizador, éstas actúan reduciendo la magnitud de la barrera energética necesaria para llevar a cabo la conversión química de una sustancia en otra. Su estructura molecular les permite tener ventajas en comparación a los catalizadores químicos como son: alta selectividad, capacidad de catalizar una amplia gama de reacciones, obtención de productos con un alto rendimiento sin la formación de subproductos y actuar bajo diferentes valores de pH y temperatura. Estas características provocan que sean cada vez más utilizadas por diversos sectores, entre los que se encuentran: la industria farmacéutica, la industria de alimentos, la industria de detergentes y la producción de “químicos finos” (Loughlin, 2000; Bornscheuer, 2002).

A nivel industrial se requiere el uso de disolventes y/o temperaturas moderadamente altas, lo que limita el uso de la mayoría de las enzimas debido a su inestabilidad. La inmovilización, la cual consiste en la localización de la enzima en una región definida del espacio, permite la obtención de formas insolubles que retienen su actividad catalítica y pueden ser reutilizadas, por lo cual se han desarrollado diferentes técnicas de inmovilización físicas o químicas (Arroyo, 1998; Cao, 2005).

La adsorción de las enzimas a un soporte para su inmovilización fue uno de los primeros métodos de desarrollados. Dentro de las ventajas que presenta esta metodología están la simplicidad, el uso de condiciones suaves, la posibilidad de una alta retención de la actividad (ya que sólo se pueden ocasionar ligeras modificaciones a la estructura nativa y a la funcionalidad de ésta porque no hay modificaciones químicas), la reversibilidad del proceso (lo que permite la purificación de proteínas por unión selectiva de la enzima al soporte), así como el re-uso del soporte (Salis *et al.*, 2003; Cao, 2005; Ganesh *et al.*, 2008).

Las enzimas de uso industrial son generalmente de origen microbiano, la mayor parte de las reacciones que catalizan son de tipo hidrolítico. El mercado está dominado por proteasas y lipasas; estas últimas han mostrado un avance

importante en el número de reacciones que catalizan, particularmente por la capacidad de llevar a cabo reacciones en disolventes orgánicos (Aehle, 2004; Villeneuve, 2007).

El género *Aspergillus* es conocido por su capacidad de producción de enzimas hidrolíticas. Se ha reportado que la especie *Aspergillus nidulans* es capaz de producir enzimas con actividad lipolítica y esterolítica (Kawasaki *et al.*, 1995; Mayordomo *et al.*, 2000; Peña-Montes, 2001). *A. nidulans* PW1 produce una proteasa con actividad esterasa codificada por el gene *prtA*, así como otras estererasas y cutinasas. Es importante mencionar que el patrón de producción de enzimas varía de acuerdo al medio de cultivo empleado (Ballesteros, 2006).

Por tanto, se considera que las enzimas presentes en el sobrenadante de *A. nidulans* PW1 pueden generar un catalizador interesante por lo que en el presente trabajo se planteó su inmovilización, caracterización y aplicación en biocatálisis.

El estudio de la adsorción de lipasas a soportes de naturaleza hidrofóbica ha sido reportado por diferentes autores, en los que destacan la adsorción favorecida de este tipo de enzimas, debido a las interacciones hidrofóbicas que se establecen entre el soporte y los residuos hidrofóbicos expuestos durante la activación interfacial (Salis *et al.*, 2003; Zúñiga, 2004; Volcan *et al.*, 2008). También se ha estudiado la inmovilización de estererasas y cutinasas a este tipo de soportes, por lo que se plantea como una estrategia interesante el uso de Accurel MP 1000 para la inmovilización de las estererasas a partir del extracto crudo de *A. nidulans* PW1.

2. Antecedentes

2.1. Biocatálisis

Los catalizadores son moléculas orgánicas o inorgánicas que aceleran una reacción química al reducir la magnitud de la barrera energética necesaria para llevar a cabo la conversión química de una sustancia en otra. Esta reducción es consecuencia de la interacción entre el sustrato y el catalizador, los cuales forman un complejo de transición activo, que permite la formación del producto y la liberación del catalizador sin alteración. Algunas reacciones pueden llevarse a cabo de manera espontánea, otras requieren ser catalizadas para que pueda proceder a la formación del producto (Fig. 1).

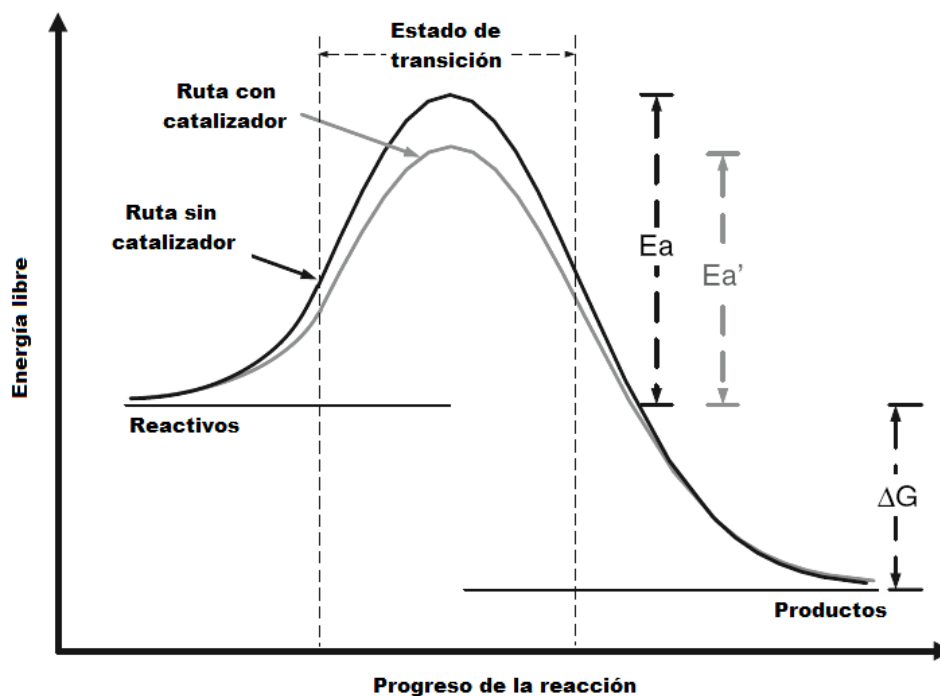


Fig. 1: Mecanismo de catálisis (Illanes, 2008).

El uso de enzimas como catalizadores para llevar a cabo la transformación de compuestos orgánicos no es nuevo. La mayor parte de los primeros estudios eran

dirigidos hacia la elucidación de las rutas metabólicas y descripción de los mecanismos de las enzimas, mientras que el potencial para emplear a las enzimas para la transformación de compuestos orgánicos fue explotado a finales de los años 80's. Como resultado de esta investigación, las enzimas han adquirido un lugar importante en la síntesis orgánica contemporánea, ya que proveen una alternativa y una herramienta cuyo uso ha ido en aumento tanto en el área industrial así como la académica (IUPAC, 1997; Bornscheuer, 2002).

Las ventajas y desventajas de la utilización de enzimas en la síntesis orgánica se describen en la Tabla 1:

Tabla 1. Ventajas y desventajas del uso de enzimas en síntesis orgánica
(Loughlin, 2000; Bommarium, 2004; Camps *et al.* 2005).

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Actúan bajo condiciones de trabajo suaves, lo que minimiza que se lleven a cabo reacciones indeseables como rearrreglos químicos. • Catalizan una amplia gama de reacciones. • Exhiben selectividad como: <ul style="list-style-type: none"> ○ Quimioselectividad: qué grupo funcional reacciona. ○ Regioselectividad: dónde reacciona. ○ Estereoselectividad: cómo reacciona (estereoquímica de los productos). • Pueden aceptar una amplia variedad de sustratos. • Pueden trabajar fuera de ambientes acuosos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Propensas a inhibición por sustrato o producto en una reacción. • Presentan su actividad catalítica más alta en disolventes acuosos. • Los rangos de operación que requieren la mayoría de las enzimas son estrechos; por lo tanto, temperaturas elevadas, pH extremos o altas concentraciones de sal, pueden llevar a la desactivación de la enzima.

Las enzimas se clasifican en 6 grandes grupos por reglas enunciadas por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), de acuerdo a la reacción química que catalizan, independientemente de su origen o de la presencia de grupos prostéticos. Estos grupos son:

- (1) Oxidoreductasas
- (2) Transferasas
- (3) Hidrolasas
- (4) Liasas
- (5) Isomerasas
- (6) Ligasas

Los nombres de las enzimas van precedidos de las iniciales EC e inician con alguno de los seis números anteriores. Dentro de estos grupos, las hidrolasas tienen un papel importante dentro de aplicaciones industriales, por lo que sus propiedades más importantes se describen a continuación.

A. Hidrolasas

Las hidrolasas (EC 3) son un grupo de enzimas que catalizan la ruptura de un enlace por la adición de una molécula de agua, y se dividen en 12 subgrupos dependiendo del tipo de enlace que hidrolizan. Son enzimas de importancia biológica ya que participan en el catabolismo proveyendo de nutrientes asimilables a la célula. (Bornscheuer y Kazlauska, 2006; Illanes, 2008).

La mayor parte de las biotransformaciones realizadas en síntesis orgánica son llevadas a cabo por las hidrolasas, por presentar características como: una amplia especificidad por el sustrato, aceptan como sustratos algunos intermediarios sintéticos, presentan alta estereoselectividad incluso hacia los sustratos no naturales. Además de la reacción de hidrólisis, las hidrolasas también pueden catalizar reacciones como condensación (reacción inversa a la hidrólisis) y alcoholólisis (ruptura de enlaces utilizando una molécula de alcohol en lugar de agua); muchas de ellas se encuentran comercialmente disponible y toleran la adición de disolventes miscibles en agua lo que permite que sean estables y activas en matrices orgánicas. Además presentan un gran potencial tecnológico ya que son enzimas robustas lo que les permite que puedan actuar bajo condiciones de proceso, no requieren de cofactores y muchas de ellas son extracelulares, por lo que su producción es simple y de bajo costo (Bornscheuer y Kazlauska, 2006; Illanes, 2008).

a) Lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace éster de triacilgliceroles de cadena larga, resultando la liberación de glicerol y ácidos grasos (Fig. 2).

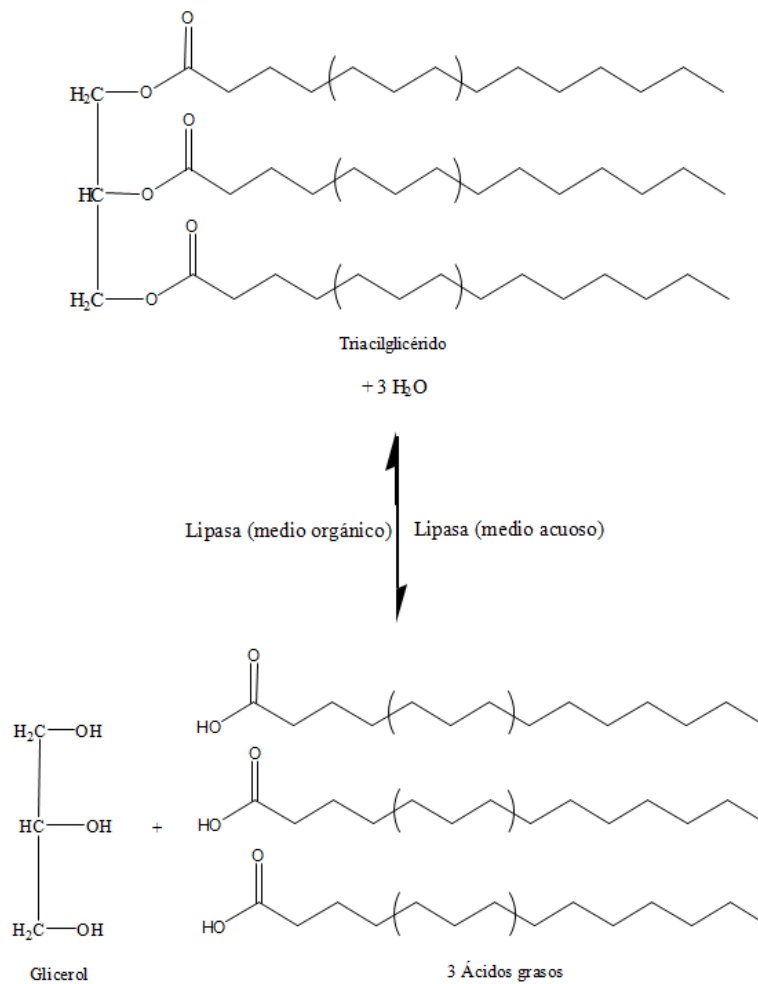


Fig. 2: Hidrólisis de triacilgliceroles por lipasas

Las lipasas son enzimas versátiles ya que aceptan un amplio rango de sustratos, poseen regio- y estereospecificidad, además de que pueden actuar en disolventes orgánicos, por lo que ofrecen una alternativa para ser explotadas en síntesis orgánica en reacciones como esterificación, transesterificación y aminólisis (Chen y Tsai., 2000; Koeller y Wong 2001; Grogan, 2008).

A partir de estudios de elucidación de la estructura 3D y estudios de cristalografía de lipasas de algunos organismos como *Geotrichum candidum*, *Rhizomucor miehei*, *Candida rugosa*, *Rhizopus delemar*, *Humicola lanuginosa*, *Candida antarctica*, entre otras, se ha observado la presencia de una estructura o “tapa” que cubre el sitio activo de estas enzimas cuando se encuentran en un medio acuoso; pero cuando interaccionan en la interfase aceite/agua la “tapa” se abre y este comportamiento es conocido como activación interfacial, el cual permite una conformación activa de la enzima haciendo accesible el centro catalítico para el sustrato (Smith *et al.*, 1992; Derewenda *et al.*, 1994; Schrag y Cygler, 1997). Para el caso de algunas lipasas, la apertura de la “tapa” es responsable de la formación de la cavidad oxianiónica, la cual está involucrada en la estabilización de los intermediarios durante la reacción de catálisis (Gonzalez-Navarro *et al.*, 2001). Sin embargo, algunas lipasas no presentan activación interfacial o no presentan la estructura de “tapa”.

Las lipasas están presentes en todos los organismos vivos pues tienen un importante papel metabólico. En bacterias pueden ser intracelulares o secretadas con la finalidad de degradar sustratos lipídicos presentes en el medio. En algunos organismos patógenos, como *Candida albicans*, *Helicobacter pylori*, así como en especies de *Staphylococcus* y *Pseudomonas*, actúan como factores de virulencia. Las enzimas de origen bacteriano o fúngico generalmente son fáciles de producir por fermentación y de extraer del medio de cultivo. Como consecuencia, un gran número de enzimas microbianas se encuentran disponibles comercialmente. Los principales géneros de hongos utilizados para la producción de lipasas de origen fúngico son *Candida*, *Humicola*, *Penicillium*, *Yarrowia*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Aspergillus* (Reetz, 2002; Polaina y MaxCabe., 2007).

b) Esterasas

Las esterasas (EC 3.1.1.1) son carboxil esterasas que catalizan la hidrólisis del enlace éster de sustratos solubles en agua, con la liberación de un ácido carboxílico y un alcohol (Fig. 3).

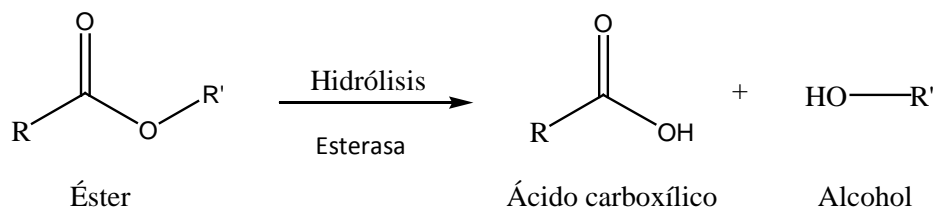


Fig. 3: Reacción de hidrólisis del enlace éster.

A diferencia de las lipasas, las esterasas actúan preferentemente sobre el enlace éster de ácidos grasos y triacilgliceroles de cadena corta, por lo que su máxima actividad es sobre sustratos solubles. Además no presentan activación interfacial ni presentan una “tapa” que cubra el sitio activo como es en el caso de las lipasas (Fojan *et al.*, 2000; Peña-Montes, 2009).

En contraste con las lipasas, sólo algunas esterasas han sido utilizadas en síntesis orgánicas, destacando el uso de la esterasa aislada del hígado y páncreas de puerco y las esterasas de origen microbiano, como las de *Pseudomonas marginata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus coagulans* y *Arthrobacter globiformis*, que han sido utilizadas en la resolución cinética de alcoholes primarios y secundarios y ácidos carboxílicos (Bornscheuer y Kazlauska, 2006).

c) Cutinasas

Las cutinasas (E.C. 3.1.1.74) son enzimas que catalizan la hidrólisis de la cutina, un poliéster compuesto por ácidos grasos, generalmente n -C₁₆ y n -C₁₈, y contienen de uno a tres grupos hidroxilo (Fig. 4).

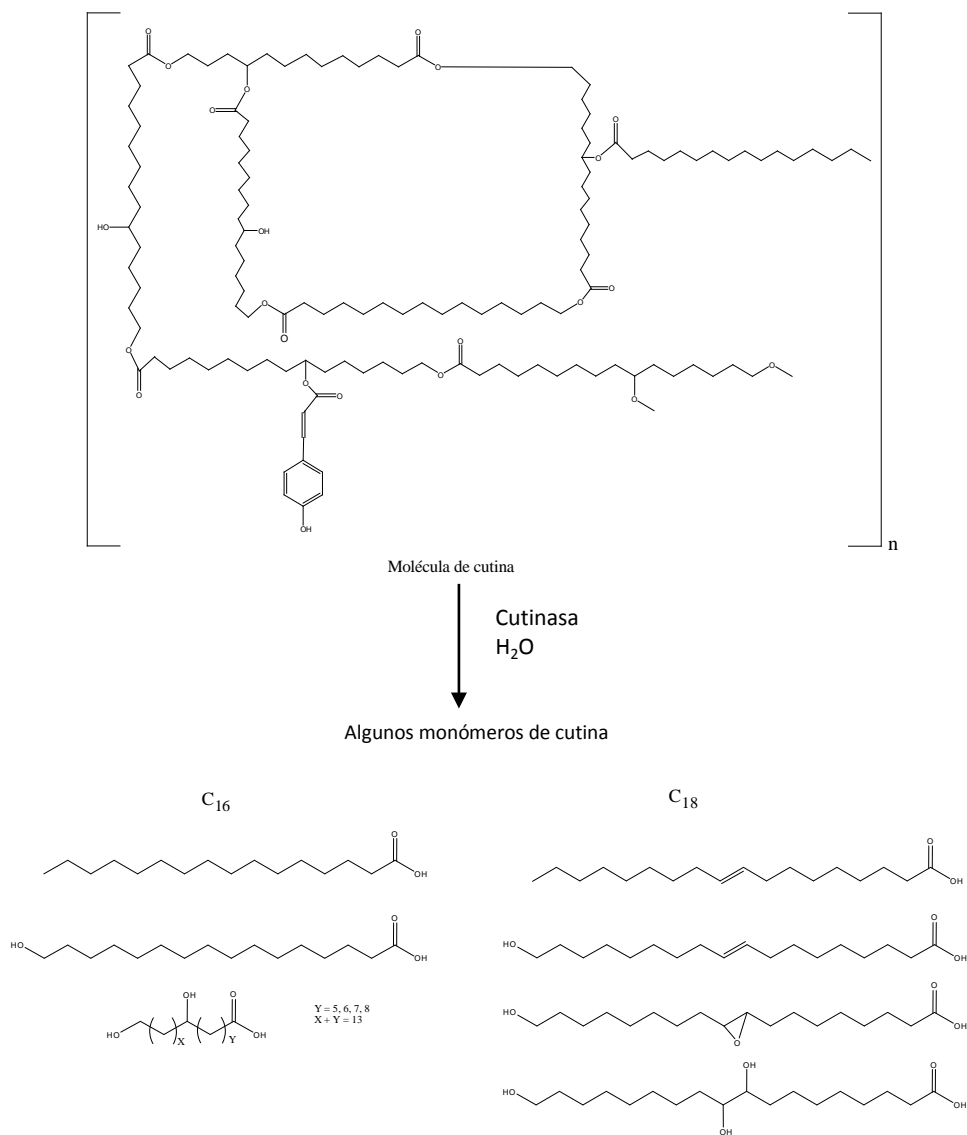


Fig. 4: Reacción de hidrólisis de la cutina.

La cutina es un componente estructural de la cutícula de las plantas y juega un papel clave en la protección contra la entrada de patógenos. Se ha visto que la degradación enzimática es uno de los primeros pasos del proceso de infección de los hongos fitopatógenos para crecer en la cutícula de las plantas y utilizan la cutina como fuente de carbono a partir de la hidrólisis de ésta con la producción extracelular de enzimas cutinolíticas, algunas de las cuales han sido purificadas y caracterizadas (Carvalho *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 1999).

Al igual que las lipasas y las esterasas, forman parte de la familia de las serin hidrolasas, que presentan la clásica triada catalítica compuesta por serina, histidina y un ácido carboxílico. De acuerdo a lo reportado por Borreguero *et al.* (2001), el sitio catalítico de la cutinasa no está protegido por una tapa, no presentan activación interfacial y la cavidad oxianiónica se encuentra preformada, siendo éstas características particulares de las cutinasas.

Las cutinasas exhiben actividad hidrolítica *in vitro* sobre una variedad de ésteres, pueden hidrolizar ésteres sintéticos solubles como los que contienen *p*-nitrofenil , así como triacilgliceroles de cadena larga insolubles. Por lo tanto, las cutinasas comparten características con lipasas y esterasas ya que hidrolizan eficientemente ésteres solubles y triacilgliceroles emulsificados (Carvalho *et al.*, 1998; Dutta *et al.*, 2009).

d) Estructura y mecanismo catalítico

Las lipasas, esterases y cutinasas pertenecen al grupo de las hidrolasas α/β , comparten estructura de plegamiento similar y por lo tanto maquinaria catalítica idéntica. El diseño del plegamiento de las hidrolasas α/β , está formado por ocho hojas β plegadas dispuestas paralelamente, a excepción de la β_2 , que se encuentra en sentido antiparalelo. De la hoja β_3 a la β_8 están conectadas a hélices dispuestas en ambos lados (Fig. 5).

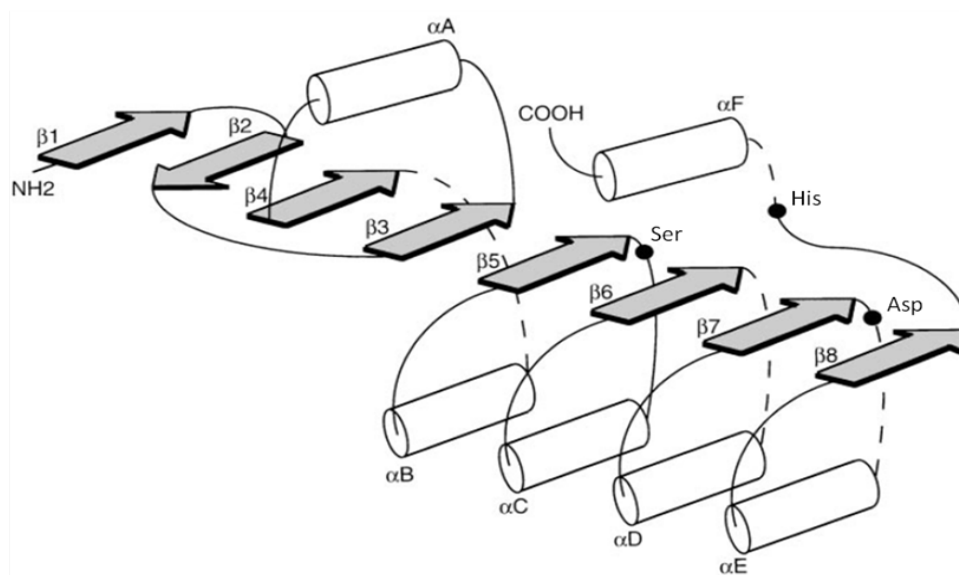


Fig. 5: Plegamiento canónico de las hidrolasas α/β . Se muestra con puntos negros la posición de los residuos de la triada catalítica (Jaeger *et al.*, 1999).

El sitio activo de estas hidrolasas α/β está conformado por la triada catalítica que comprende un residuo de serina, el cual es un aminoácido nucleófilo localizado en

el extremo carboxilo de la hebra $\beta 5$, un residuo ácido, que puede ser aspártico o glutámico, y un residuo de histidina.

El mecanismo de hidrólisis del sustrato consiste en el incremento del carácter nucleofílico de la serina por la transferencia de un protón del residuo de histidina, conduciendo al ataque por parte del átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la serina sobre el carbono del grupo carbonilo del enlace éster susceptible [1]. Se forma un intermediario tetrahédrico, donde el átomo del oxígeno del carbonilo se carga negativamente, y se estabiliza a través de puentes de hidrógeno con los grupos -NH de la cadena principal. Estos residuos construyen la cavidad oxianiónica que, en algunas lipasas y en el caso de las cutinasas es preformada con la orientación correcta [2]. A continuación, la histidina dona un protón al oxígeno del éster en el enlace en el cual se lleva a cabo la ruptura, se libera el alcohol y se forma un segundo intermediario con el ácido graso del sustrato que se encuentra esterificado a la serina (enzima acilada) [3]. El siguiente paso consiste en la reacción de desacetilación, en la que ocurre un ataque nucleofílico al átomo de carbono del carbonilo del intermediario covalente por parte de una molécula de agua, que provoca la ruptura del enlace éster entre la serina y el componente acilo y resulta en la liberación del producto y la regeneración de la enzima [4] (Fig. 6) (Jaeger *et al.*, 1999; Bornscheuer y Kazlauska, 2006).

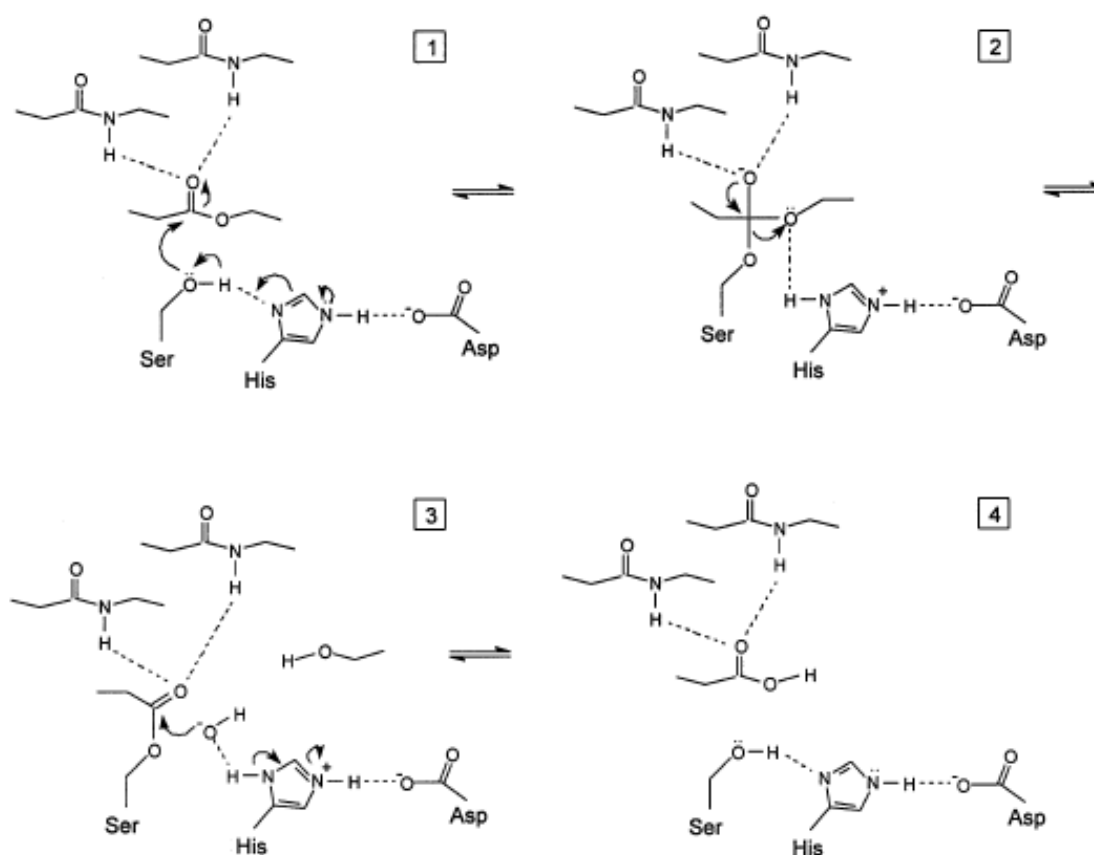


Fig. 6: Mecanismo de hidrólisis de las hidrolasas α/β en el sitio activo. [1] Ataque nucleofílico; [2] Intermediario tetrahédrico; [3] Desacetilación; [4] Liberación del producto y regeneración de la enzima (Jaeger *et al.* 1999).

Es importante mencionar que este mecanismo de hidrólisis también lo comparten las serin proteasas, las cuales presentan un sitio activo compuesto por una triada catalítica similar al de las esterases, lipasas y cutinasas (Shrag y Cygler, 1997).

B. Aplicación e importancia económica de las hidrolasas.

Dentro de las enzimas hidrolíticas, las esterasas, lipasas y cutinasas han adquirido un especial interés por su potencial para ser aplicadas a nivel industrial, debido a las características estructurales que presentan y una alta regio y estereoselectividad (Koeller y Wong, 2001; Bornscheuer, 2002).

Algunas de las aplicaciones de acuerdo al área industrial en la que han sido utilizadas se muestran en la Tabla 2 (Carvalho *et al.*, 1998; Whiterhurst y Law, 2002; Panda y Gowrishankar, 2005; Fontes y Alves, 2009).

Tabla 2: Aplicaciones industriales de esterasas, lipasas y cutinasas microbianas.

INDUSTRIA	APLICACIÓN O PRODUCTO
ALIMENTOS	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrólisis de la grasa de la leche con la generación de aromas y sabores. • Mejoramiento de las propiedades de los productos de panadería. • Aromas para bebidas. • Compuestos saborizantes. Ej.: ésteres de terpenos • Transesterificación de grasas y aceites.
FARMACÉUTICA	<ul style="list-style-type: none"> • Síntesis de intermediarios quirales de medicamentos. • Síntesis de compuestos como emulsificantes y agentes humectantes de cosméticos.
QUÍMICA	<ul style="list-style-type: none"> • Composición de detergentes • Manufactura de papel. • Tratamiento de tejidos sintéticos. • Químicos finos.
AMBIENTAL	<ul style="list-style-type: none"> • Degradación de compuestos contaminantes como poliuretano, plásticos y poliésteres. • Degradación de compuestos organofosforados (insecticidas y pesticidas).

Una de las aplicaciones que ha adquirido mayor interés es la biotransformación de compuestos como ácidos fenólicos y flavonoides, entre otros, los cuales

naturalmente se encuentran presentes en frutas y vegetales. La importancia de estos compuestos es que exhiben actividad biológica en la que se incluyen actividad antioxidante, anticancerígena y antimicrobiana, la cual se debe a la estructura química que presentan. Por lo tanto, el uso de éstos resulta atractivo en el área de alimentos, farmacéutica y cosmética. Su uso es limitado en matrices oleosas debido a que son compuesto hidrofílicos.

Se ha reportado por algunos autores el aumento de la solubilidad de estos compuestos mediante rutas quimio-enzimáticas o solamente enzimáticas en las que se llevan a cabo reacciones de acetilación y/o desacetilación de la molécula, que conducen a cambios en las propiedades de solubilidad en ambientes hidrofóbicos, además de que las reacciones son regioselectivas y disminuye la toxicidad de la reacción (Mellou *et al.*, 2005; Chebil *et al.*, 2006; Villeneuve, 2007).

a) Ácido kójico

El ácido kójico (5-hidroxi-2-(hidroximetil) 4-pirona) (Fig. 8) es un metabolito fúngico producido por algunas especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. Fue descubierto en 1907 por Saito durante sus estudios sobre la fermentación de arroz cocido a vapor ("koji") por *Aspergillus oryzae*. En 1912, Yabuta estableció la fórmula empírica $C_6H_6O_4$ y le dio el nombre de ácido kójico, y realizó una extensa investigación relacionada a la maximización de su producción, poder antiséptico y otras propiedades. En 1924, Barger y colaboradores determinaron su estructura (Fig. 7) (Birkinshaw *et al.*, 1931; Burdock *et al.*, 2001).

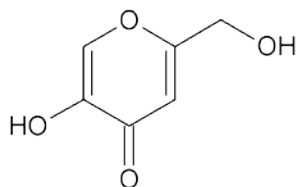


Fig. 7: Estructura del ácido kójico.

El grupo hidroxilo de la posición 5 tiene carácter de un alcohol fenólico, al cual se debe el carácter ácido de la molécula; su reactividad se ve incrementada por el átomo de oxígeno que se encuentra en el carbonilo adyacente. (Beélik, 1956)

Se ha encontrado en alimentos fermentados orientales como *sake*, *miso* (pasta de soya), *shoyu* (salsa de soya), *amazake* (bebida dulce), *shouchu* (bebida alcohólica destilada) y *mirin* (sazonador alcohólico dulce).

Ha sido reconocido por su efecto inhibitorio contra la polifenol oxidasa (PPO), así como inhibidor de la tirosinasa, como secuestrador de radicales libres, por presentar actividad quelante de iones metálicos y por prevenir daño por radiación UV. Ha sido empleado en la industria de alimentos como aditivo para prevenir el

pardeamiento enzimático, así como en formulaciones cosméticas para inhibir la producción de melanina y así favorecer el blanqueamiento de la piel (Burdock *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2007; Synytsya *et al.*, 2008).

Debido a que el ácido kójico es hidrosoluble, presenta dificultad e inestabilidad para ser utilizado a nivel industrial en matrices de cosméticos y algunos alimentos de naturaleza oleosa. Por tal razón, se ha evaluado la síntesis de ésteres de ácido kójico por métodos químicos, como su esterificación con ácidos grasos en presencia de un ácido o álcali como catalizador, con resultados limitados en la obtención de un producto bioactivo. Una alternativa es el aumento de la lipofilidad del ácido kójico por medio de esterificación con el empleo de enzimas, el cual resulta un método más adecuado, además de que lo convierte en un producto no tóxico (Liu y Shaw, 1998).

2.2. Inmovilización

El empleo de enzimas bajo condiciones de trabajo en la industria, así como en reacciones de química orgánica, donde se requiere el uso de disolventes y/o temperaturas moderadamente altas es limitado debido a su inestabilidad. Sin embargo, se puede conseguir por medio de su inmovilización, que consiste en la confinación o localización de la enzima en una región definida, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y pueden ser utilizadas repetidamente (Hartmeier, 1985, Arroyo, 1998; Cao, 2005; Mateo *et al.*, 2007; Sánchez-Otero *et al.*, 2008).

El uso de enzimas inmovilizadas presenta ciertas ventajas con respecto a las enzimas solubles como son:

- ✓ Permitir el diseño de procesos continuos
- ✓ Fácil separación del biocatalizador y del producto
- ✓ Mejora operacional de la enzima (estabilidad a diferentes valores de pH, termoestabilidad, actividad en presencia de disolventes)
- ✓ Posible reutilización del biocatalizador
- ✓ Disminución de los costos del proceso

Sin embargo, también pueden presentarse inconvenientes durante el proceso de inmovilización como:

- ✗ Alteración de la conformación de la enzima lo que provocará que se vea afectada la actividad de la enzima
- ✗ Heterogeneidad del sistema enzima-soporte
- ✗ Los costos del biocatalizador pueden ser elevados

A. Métodos de inmovilización de enzimas.

En general los métodos de inmovilización se clasifican dentro de dos grandes grupos: la retención física y la unión química al soporte, los cuales a su vez se dividen como se muestra en el diagrama de la Fig. 8:

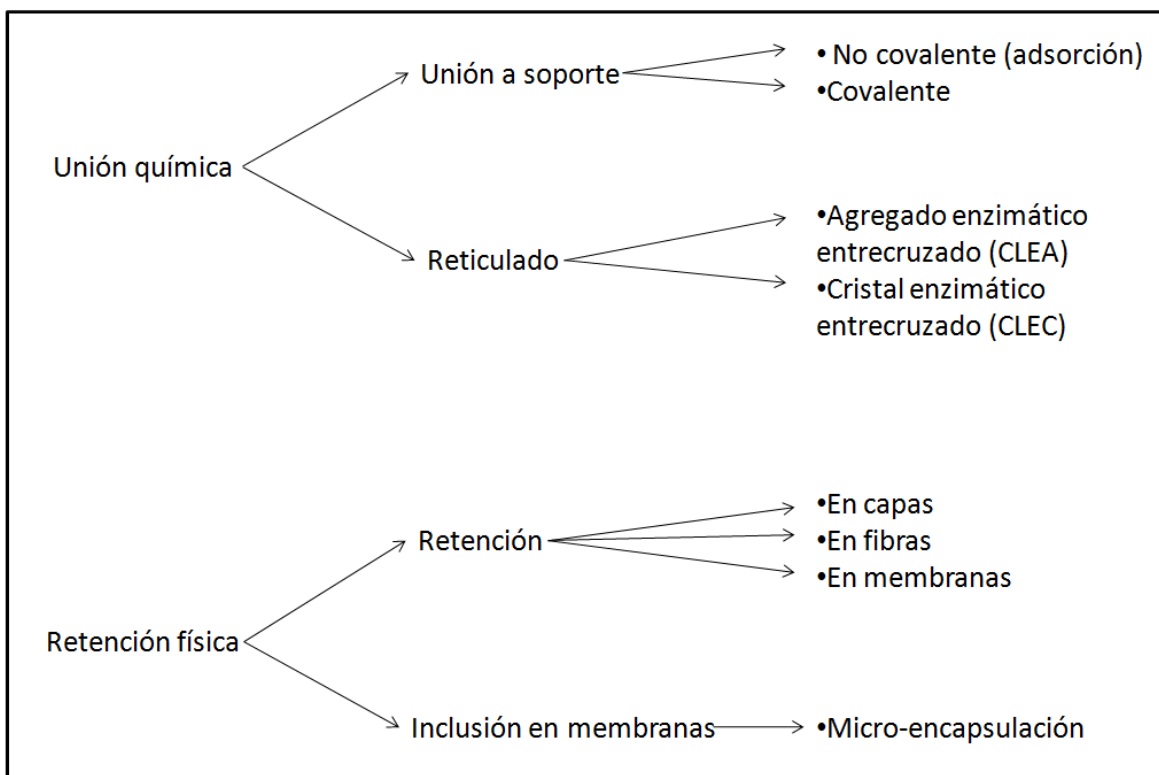


Fig. 8: Métodos de inmovilización.

En ocasiones se presentan problemas que no pueden ser solucionados por un método individual y por esta razón han sido desarrolladas variaciones con la combinación de los métodos básicos mencionados anteriormente (Bickerstaff, 1997; Arroyo, 1998; Illanes, 2008).

a) Métodos de inmovilización por unión química.

Unión covalente

En general este método de inmovilización involucra la formación de un enlace covalente entre el soporte sólido y la enzima (Fig. 9). Esta unión se establece a través de grupos funcionales presentes en la superficie del soporte y los residuos de aminoácidos localizados en la parte externa de la enzima. Los principales grupos involucrados en la formación del enlace covalente son el grupo amino (NH_2) de la lisina y la arginina, el grupo carboxilo (CO_2H) del ácido aspártico y el ácido glutámico, el grupo hidroxilo (OH) de la serina y la treonina y el grupo sulfhidrilo (SH) de la cisteína.

Para lograr una unión eficiente, el soporte y / o la enzima deben de ser activados antes de la inmovilización.

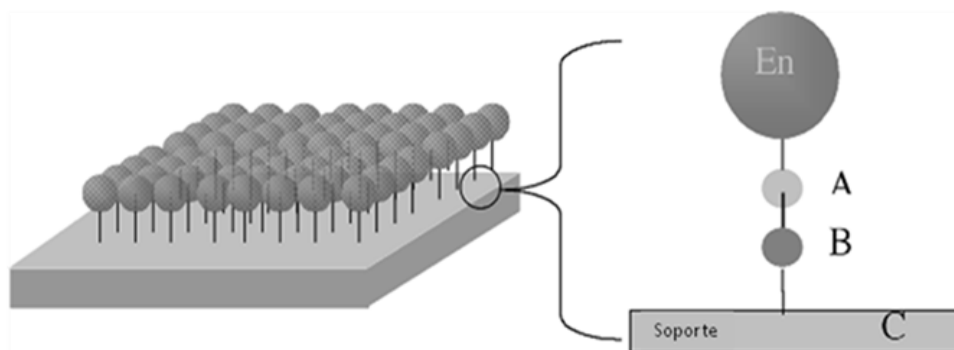


Fig. 9: Inmovilización por enlace covalente: (A) residuo activo de aminoácido; (B) Grupo funcional de unión del soporte; (C) soporte; (En) enzima (Cao, 2005).

Este tipo de inmovilización es de los más utilizados, ya que debido a la naturaleza de los enlaces formados entre la matriz y la enzima, ésta no se liberará en la solución una vez que es utilizado. Por esta razón este tipo de métodos se emplea

cuando se requiere estrictamente la ausencia de enzima en el producto (Cao, 2005; Guisan, 2006).

Reticulado o Entrecruzamiento

Este tipo de inmovilización involucra la unión de células o de enzimas entre sí para formar una estructura tridimensional compleja (Fig. 10) (Bickerstaff, 1997).

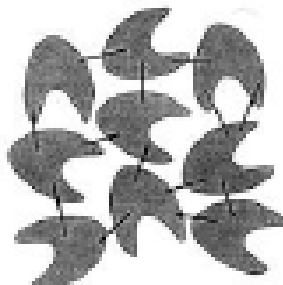


Fig. 10: Inmovilización por entrecruzamiento (Bickerstaff, 1997).

La inmovilización por entrecruzamiento puede ser efectuada en proteínas enzimáticas solubles (CLE), en cristales de proteína de enzimas (CLEC) o en agregados de proteínas (CLEA). Estos sistemas sólo difieren del precursor proteínico que va a ser entrecruzado y tiene la ventaja de que no está involucrado la presencia de un soporte inerte, ya que es un proceso de autoinmovilización con la propia masa de proteína, por lo tanto, la actividad específica del biocatalizador es alta.

Las CLEs han dejado de ser utilizadas debido a sus propiedades mecánicas deficientes. Mientras que las CLEC han mostrado excelentes propiedades, como una alta estabilidad bajo condiciones extremas como: altas temperaturas, valores de pH extremos y el uso de disolventes orgánicos, presentan resistencia a la autólisis para el caso de proteasas o al efecto de proteólisis exógena. Tienen una

alta actividad volumétrica y específica, poseen buenas propiedades mecánicas y la recuperación del biocatalizador después de su utilización es simple. Sin embargo, la principal desventaja que presentan es el alto costo del biocatalizador debido al alto grado de pureza de la enzima que se requiere para llevar a cabo la cristalización.

Los CLEA son producto de enlaces entrecruzados de agregados de proteínas que se obtienen a partir de técnicas convencionales de precipitación de proteínas. Estos pueden ser preparados fácilmente: primero, se induce la agregación de un extracto enzimático por la adición de sales, disolventes orgánicos o polímeros, bajo condiciones experimentales suaves para mantener una buena actividad enzimática. Una vez agregados, mediante una agitación fuerte se promueve la reducción del tamaño de partícula y finalmente, éstos se estabilizan por entrecruzamiento, generalmente con el uso de glutaraldehído (Guisan, 2006; Illanes, 2008;).

b) Métodos de inmovilización por retención física.

Retención

Las técnicas de retención son métodos sencillos de inmovilización de enzimas y de células. Las enzimas o las células deben de ser primero dispersadas en una disolución y después sujetas a un proceso de solidificación, con la finalidad de formar una barrera física (Fig 11).

Por definición, la retención de enzimas se refiere al proceso en el que las enzimas son embebidas a una matriz formada física o químicamente. En general, la matriz de retención es formada durante el proceso de inmovilización, por lo tanto los

precursores que permiten la formación de la matriz deben de ser compatibles con las enzimas.

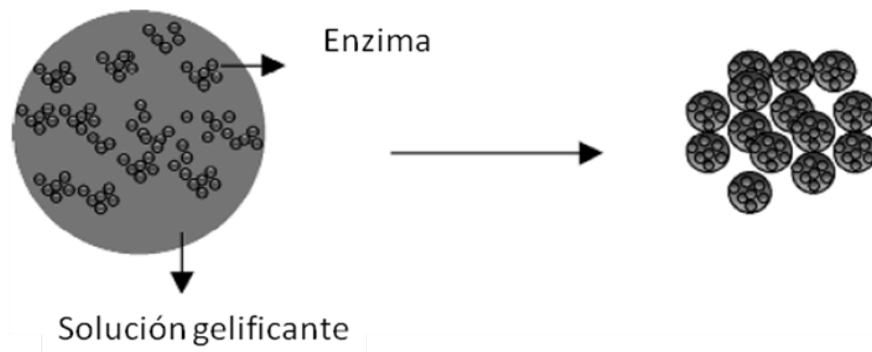


Fig. 11: Inmovilización por retención (Cao, 2005).

La matriz formada debe de ser permeable a pequeñas moléculas de sustrato y producto. Esta puede ser preparada en forma de camas, membranas, películas, discos y fibras (Cao, 2005).

Inclusión en membranas

El método consiste en la encapsulación de células o enzimas en solución o liofilizadas, con la formación de una membrana de polímero semipermeable con un rango de diámetro ente 1 a 100 μm , a fin de formar una barrera física alrededor de la preparación enzimática (Fig. 12).

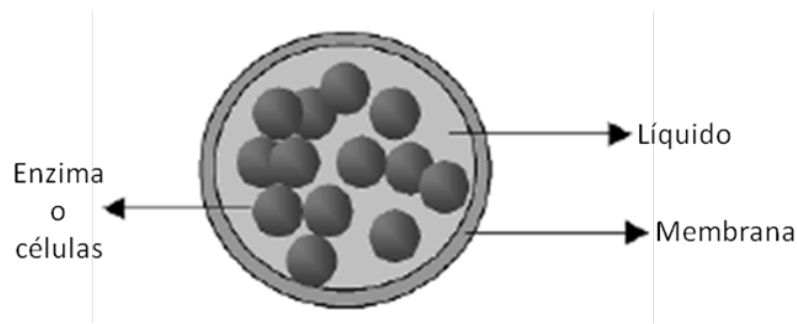


Fig. 12: Inmovilización por encapsulación (Cao, 2005).

Las membranas pueden ser permanentes, las cuales se originan por polimerización interfacial, o no permanentes, generadas por surfactantes y llamadas también micelas reversas (Arroyo, 1998).

Aunque las enzimas están físicamente confinadas en el interior de la membrana formada, los sustratos y productos pueden difundir libremente a través de la membrana, dependiendo del tamaño de poro (Cao, 2005).

c) Inmovilización por el método de adsorción.

La adsorción de enzimas a un soporte fue uno de los primeros métodos de inmovilización desarrollados. Es sencillo e involucra interacciones reversibles entre las enzimas o las células y el material de soporte. Las fuerzas que están involucradas son en su mayoría electrostáticas, como interacciones iónicas, fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno. Estas fuerzas son débiles en comparación a un enlace covalente, sin embargo se establecen en un número suficiente que permite la unión de la enzima al soporte.

El procedimiento consiste en mezclar el contenido biológico (extracto enzimático o celular) y el soporte con propiedades adsorptivas por un periodo de incubación, bajo condiciones adecuadas de pH, fuerza iónica y temperatura. En seguida se recolecta el material inmovilizado, al cual se le realiza una serie de lavados para retirar los componentes que no se unieron al soporte. Normalmente sólo se presenta una ligera modificación a la enzima o célula por este método de inmovilización.

En las últimas décadas las técnicas de inmovilización de enzimas por adsorción han sido estudiadas debido a las ventajas que presenta:

1. Ligero o nulo daño a las enzimas o células.
2. Sencillo, económico y rápido.
3. No hay cambios químicos del soporte o de las enzimas o células.
4. Reversibilidad, lo que permite obtener de nuevo las enzimas o células.

Las desventajas incluyen:

1. Desprendimiento de las enzimas o células del soporte y/o contaminación del producto.
2. Unión al soporte no específica.
3. Sobrecarga del soporte.
4. Impedimento estérico por el soporte.

Dentro de las desventajas mencionadas anteriormente, se puede considerar el desprendimiento del biocatalizador del soporte como la más importante. La desorción puede ocurrir bajo diferentes circunstancias como son cambios en pH, temperatura y fuerza iónica. En ocasiones las enzimas que se habían adsorbido firmemente al soporte, pueden desorberse durante una reacción por efecto de la unión de la enzima al sustrato, por unión de contaminantes que se encuentran

presentes en el sustrato, por la formación del producto, velocidad de fluido, agitación y por la abrasión partícula – partícula. Sin embargo, en ocasiones esta desventaja puede convertirse en una ventaja si se requiere la recuperación del soporte (Brickerstaff, 1997).

Dentro de los principales factores que influyen la adsorción de las enzimas al soporte encontramos: pH del medio, ya que dependiendo de éste será la carga que adquirirá la proteína y el soporte; la fuerza iónica, con la cual se ha observado que a mayor fuerza se favorece la desorción de la enzima ya que los iones inorgánicos comienzan a competir por la unión al soporte; y el diámetro del poro, el cual debe de ser 1.5 – 2 veces mayor al eje mayor de la enzima (Arroyo, 1998).

i. Efecto en la estabilidad

Una de las ventajas que comúnmente se cita es la estabilidad por efecto de la inmovilización de la enzima al soporte, la cual depende de las propiedades de la enzima, del soporte (naturaleza química y propiedades físicas), del microambiente de la enzima, de la temperatura y de la unión que se establece entre la enzima y el soporte.

La estabilidad principalmente se debe a razones como la estabilización conformacional por unión al soporte en donde adquiere una estructura terciaria de mayor rigidez que evita o disminuye la inactivación térmica o química. También se observa que se evita la formación de agregados intermoleculares, ya que la enzima se encuentra retenida en una región del espacio y, en el caso de la adsorción, se da un arreglo ordenado de la enzima al soporte con la formación de una monocapa (Arroyo, 1998; Cao, 2005).

ii. Adsorción de enzimas lipolíticas.

La inmovilización de lipasas a soportes de naturaleza hidrofóbica es uno de los métodos ampliamente estudiados por diferentes autores, se propone que la superficie hidrofóbica que rodea el sitio activo de la enzima durante la activación interfacial, permite que ésta sea adsorbida favorablemente al soporte por interacciones hidrofóbicas. Dentro de las ventajas que se presentan se encuentran: ligeras modificaciones a la enzima que tengan efecto en la actividad, hiperactivación de la mayoría de las lipasas, adsorción selectiva y recuperación del soporte por desorción de la enzima (Salis *et al.*, 2003; Zuñiga, 2004; de Oliveira *et al.* 2006; Volcan *et al.*, 2008).

De una variedad de matrices disponibles para la adsorción de enzimas, las resinas poliméricas de polipropileno microporoso como el Accurel MP 1000 (Fig. 13) (Tabla 3), han mostrado características útiles para la adsorción de hidrolasas (Salis *et al.*, 2003; Gupta *et al.* 2005; Sabbani *et al.* 2006).

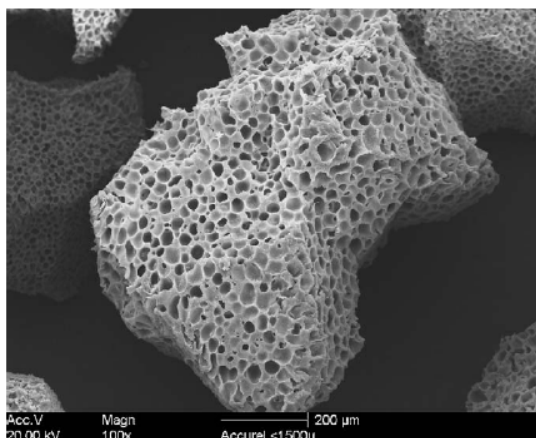


Fig. 13: Accurel MP 1000 < 1500 μm (aumento 100x). (Sabbani *et al.* 2006).

Tabla 3: Características físicas del Accurel MP 1000

Propiedad física	Soporte Accurel MP 1000
Composición	Polipropileno
Naturaleza	Hidrofóbica
Tamaño de poro (μm)	5 – 20
Tamaño de partícula (μm)	< 1500
Densidad de partícula (g/cm^3)	0.1 – 0.12
Capacidad máxima de aditivo ¹ (% (w/w))	70

¹ Capacidad máxima de aditivo: relación entre el peso del aditivo adsorbido en el polímero y el peso total del biocatalizador en % (w/w).

2.3. *Aspergillus nidulans*.

Los hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor* y *Penicillium*, han sido reconocidos como una importante fuente de obtención de enzimas lipolíticas extracelulares y de fácil extracción para la industria, destacando el género *Aspergillus* en procesos biotecnológicos (Mayordomo *et al.*, 2000; Da Silva *et al.*, 2008; Mhetras *et al.*, 2008;), que pertenece a la familia de los ascomicetos. Tiene un crecimiento rápido en medio sólido o líquido bajo una variedad de condiciones nutricionales. Es normalmente haploide pero también se puede inducir su crecimiento como diploide vegetativo. Produce esporas asexuales (conidia) y esporas sexuales (ascoesporas).

Aspergillus nidulans es una especie que sirve de modelo de estudio en genética y biología celular, ya que está relacionado cercanamente a un amplio número de especies de *Aspergillus* de importancia industrial y médica como son: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus*. También se han aislado un número de auxótrofos, mutantes que difieren en sus rutas metabólicas y mutantes para el estudio de la expresión de genes, lo que lo convierte en una herramienta útil dentro de la investigación (An, 2005).

En estudios con *A. nidulans* se ha reportado la expresión, aislamiento y caracterización de enzimas que llevan a cabo la hidrólisis de enlaces éster, con potencial biotecnológico como son la lipasa WG 312 reportada por Mayordomo *et al.* (2000), actividades cutinolíticas y lipolíticas por García-Lepe *et al.* (1997), la esterasa Stcl por Peña-Montes *et al.* (2009), por mencionar algunos.

De la base de datos del genoma de *A. nidulans* (Galagan *et al.*, 2005) se presentan 45 secuencias de lipasas, esterasas y cutinasas (Peña-Montes, 2009) que se muestran en la Tabla 4:

Tabla 4: Secuencias de carboxilesterasas encontradas en el genoma de *A. nidulans*

Dominio	Secuencias
Lipasa 3	4
Lipasa	4
Lipasa con motivo GDSL	9
Lipasa secretoria	2
Esterasa	1
Cutinasa	4
Carboxilesterasa	18
α/β hidrolasa asociada a lipasa	1
Otras	2
<i>Total</i>	<i>45</i>

Por lo tanto, se espera la producción de enzimas con actividad de esterasa, las cuales están reguladas por las condiciones del medio (Cohen 1973; Katz *et al*, 2000). La presencia de esterases se caracterizará por la especificidad hacia sustratos de cadena corta solubles, mientras que en el caso de enzimas cutinolíticas hay una mayor afinidad hacia sustratos insolubles.

3. Hipótesis

- Si se pone un soporte de naturaleza hidrofóbica (Accurel MP 1000) en contacto con un extracto concentrado de *Aspergillus nidulans* PW1, se esperará que se vea favorecida la inmovilización de las esterasas debido a las interacciones hidrofóbicas que se establecerán entre el soporte y las enzimas.
- Si se inmovilizan las esterasas a partir de un extracto concentrado de *Aspergillus nidulans* PW1 por el método de adsorción al soporte Accurel MP 1000, se esperará un aumento en la estabilidad de la enzima frente a diferentes valores de pH y temperatura.
- Si la enzima inmovilizada posee actividad de esterasa, se esperará la ruptura selectiva de un sólo enlace éster de la molécula de dilaurato de ácido kójico con la liberación del ácido kójico monosustituido y un ácido láurico.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

- ❖ Realizar la inmovilización de las esterasas a partir de un extracto crudo de *Aspergillus nidulans* PW1, en un soporte hidrofóbico (Accurel MP1000) por medio del método de adsorción física para su posterior caracterización y su empleo en una reacción de hidrólisis sobre un sustrato con posible actividad antioxidante.

4.2. Objetivos particulares

- ❖ Obtener y concentrar las esterasas a partir de un extracto crudo de *Aspergillus nidulas* PW1.
- ❖ Conocer las condiciones de inmovilización de las esterasas a partir del extracto crudo de *Aspergillus nidulans* PW1.
- ❖ Caracterizar y comparar las propiedades catalíticas de la enzima inmovilizada y el extracto crudo, determinando la actividad óptima a pH y temperatura, estabilidad a pH, estabilidad térmica y especificidad por largo de cadena.
- ❖ Conocer la actividad de la enzima inmovilizada en la hidrólisis del dilaurato de ácido kójico.

5. Desarrollo experimental

5.1. Reactivos

Tabla 5: Reactivos y marcas

Reactivo	Marca
○ Aceite de oliva extra puro	Sigma
○ Ácido acético glacial	Baker
○ Acetato de etilo	Baker
○ Acetato de sodio	Baker
○ Acetona	Sigma
○ Acrilamida/biscarilamida	Biorad
○ Agar bacteriológico	Oxoid
○ Albúmina sérica bovina	Sigma
○ Alcohol etílico	Tecsiquim
○ Arginina	Sigma
○ Azul de Coomassie concentrado	Bio-Rad
○ Biotina	Sigma
○ Carbonato de sodio	Baker
○ Cloruro de cobalto hexahidratado	Baker
○ Cloruro de manganeso	Baker
○ Cloruro de potasio	Baker
○ EDTA tetrasódico	Baker
○ Extracto de levadura	Oxoid
○ Diclorometano	Merck
○ Dextrosa	Baker
○ Sacarosa	Baker
○ Fast red TR	Sigma
○ Fosfato de potasio monobásico	Baker
○ Fosfato de potasio dibásico	Mallinckrodt
○ Hexano	Baker
○ Hidróxido de potasio	Baker
○ Hidróxido de sodio	Baker

○ Kit de tinción de plata	Fermentas
○ Leche descremada	Difco
○ Marcadores de peso molecular Low range	Fermentas
○ Membrana de límite de extracción 10 000 Da	Milipore
○ Metionina	Research organics
○ Molibdato de amonio hidratado	Baker
○ α -naftil acetato	Sigma
○ Nitrato de sodio	Reasol
○ <i>p</i> -nitrofenol 10 μ mol/ml (solución estándar)	Sigma
○ <i>p</i> -nitrofenil acetato	Sigma
○ <i>p</i> -nitrofenil estearato	Sigma
○ <i>p</i> -nitrofenil laurato	Research organics
○ <i>p</i> -nitrofenil miristato	Sigma
○ <i>p</i> -nitrofenil palmitato	Sigma
○ Peptona	Bacto
○ Placas de aluminio de gel de sílice con un espesor de 0.2 mm Sil G/UV ₂₅₄	Macherey - Nagel
○ Placas de aluminio de gel de sílice con un espesor de 1.0 mm Sil G/UV ₂₅₄	Macherey - Nagel
○ Polipropileno microporoso en polvo MP-1000	Membrana
○ Reactivos de electroforesis	BioRad
○ SDS	Sigma
○ Sulfato cúprico	Baker
○ Sulfato ferroso 7 hidrato	Baker
○ Sulfato de magnesio	Merck
○ Sulfato de zinc	Baker
○ Tolueno	Monterrey
○ Tris-hidroximetilaminometano	Baker
○ Triton X-100	Research organics
○ Tween 80	Cosmopolita

5.2. Métodos

A. Microorganismo y conservación.

Se utilizó *Aspergillus nidulans* PW1, cepa auxótrofa a arginina proporcionada por el Dr. Jesús Aguirre, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las esporas de *A. nidulans* fueron cosechadas de placas de medio mínimo y resuspendidas en una solución de leche descremada al 5 % y se conservaron en sílica gel a 4°C.

B. Medio de cultivo y activación de la cepa.

Medio mínimo.

Se elaboró el medio de acuerdo con lo sugerido por Käfer (1977) siguiendo las proporciones mostradas en la Tabla 6 (Käfer y Hill, 2001):

Tabla 6: Composición del medio mínimo para el crecimiento de *A. nidulans* PW1.

Compuesto	Concentración
Sales 20 x *	50 mL/L
Elementos traza 100 x **	1 mL/L
Glucosa	10 g/L
Agar	12.5 g/L

* Composición en la Tabla 7.

** Composición en la Tabla 8.

Se ajustó el pH a 6.5 con una solución de sosa al 50% y se esterilizó a 121°C por 15 min.

Las disoluciones de sales 20 x y de los elementos trazas 100 x se prepararon de acuerdo a las siguientes cantidades que se exponen en las Tablas 7 y 8:

Tabla 7: Composición de la disolución de sales 20 x.

Compuesto	Concentración
NaNO ₃	120 g/L
KCl	10.4 g/L
MgSO ₄ •7H ₂ O	10.4 g/L
KH ₂ PO ₄	30.4 g/L

Tabla 8: Composición de la disolución de elementos traza 100 x.

Compuesto	Cantidad por 100 mL
ZnSO ₄ •7H ₂ O	2.20 g
H ₃ BO ₃	1.10 g
MnCl ₂ •4H ₂ O	0.50 g
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.50 g
CoCl ₂ •6H ₂ O	0.16 g
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.16 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	0.11 g
Na ₄ EDTA	5.00 g

Se adicionaron en el orden descrito cada una de las sales a un volumen de 80 mL de agua destilada, disolviendo perfectamente cada una antes de agregar la

siguiente. Se calentó la solución a ebullición, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se aforó a 100 mL con agua destilada.

Al medio mínimo para el crecimiento de *A. nidulans* PW1 se le adicionaron los requerimientos nutricionales de la cepa señalados en la Tabla 9:

Tabla 9: Requerimientos nutricionales de *A. nidulans* PW1.

Compuesto	Solución Stock	Concentración por litro de medio
Arginina	16.8 %	5.0 mL/L
Biotina	0.05 %	0.5 mL/L
Metionina	0.06 mM	0.011 g/L

La arginina se disolvió en agua destilada. La biotina se disolvió en etanol al 70 %. Todos los reactivos se almacenaron a 4°C.

Reactivación del microorganismo.

En cajas petri de medio mínimo se sembraron de 2 a 3 granos de sílica gel y se incubaron a 37°C durante 5 a 7 días.

Cosecha de esporas.

Se adicionaron 10 mL de Tween 80 al 0.1 % directamente sobre la caja petri de medio mínimo donde se sembraron los granos de sílica. Posteriormente se rasparon las esporas con un asa micológica y se recuperaron en un tubo desechable Falcon de 50 mL. Se centrifugaron durante 10 min a 8500 rpm (Centrifuga Biofuge Primo R). El sobrenadante se desechó, se adicionaron 10 mL de agua destilada y se centrifugó bajo las condiciones anteriormente descritas. Esta operación se repitió 2 veces y finalmente se resuspendieron las esporas en 5

mL de agua destilada. Se almacenaron a 4°C. Se realizó un conteo de esporas en el microscopio con un hematocitómetro.

C. Producción de la enzima.

Medio optimizado

El medio mínimo descrito por Käfer (1977) ajustado a pH 6.5, se modificó de acuerdo a la optimización descrita por Peña-Montes (2001) y Castro-Ochoa (comunicación oral), al adicionar sacarosa (0.5 %) como fuente de carbono, así como extracto de levadura (0.5 %) como fuente de nitrógeno y aceite de olivo, de acuerdo con lo que se muestra en la Tabla 10:

Tabla 10: Composición final del medio optimizado con sacarosa para el crecimiento de *A. nidulans* PW1.

Compuesto	Concentración
Sales 20x	50 mL/L
Elementos traza	1 mL/L
Extracto de levadura	0.5 %
Arginina (16.8 %)	5 mL/L
Biotina (0.05 %)	0.5 mL/L
Metionina (0.6 nM)	1.25 mL/L
Sacarosa	0.5 %
Aceite de olivo	0.5 %

Las disoluciones de las sales 20x, los elementos traza y los requerimientos nutricionales se prepararon de la misma forma en la que se indica en las Tablas 7, 8 y 9. Se adicionaron los compuestos en orden de acuerdo a la Tabla 10 para que

de esta forma se pueda emulsificar el medio, se utilizó un homogenizador (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel Ika® Labortechnik) a una velocidad de 13,500 rpm durante 1 min. Se esterilizó en la autoclave (SM300, Yamamoto) a 121°C por 15 min.

Para la producción de la enzima se inocularon 1×10^6 esporas/mL de *A. nidulans* PW1 en 50 mL de medio optimizado empleando matraces de 250 mL. La fermentación se realizó por 24 h a 37°C a 350 rpm de agitación orbital (Innova 40, New Brunswick Scientific).

D. Métodos de determinación de actividad enzimática y proteína.

La cuantificación de la actividad enzimática y la concentración de proteína se practicaron a muestras colectadas durante la fermentación, ultrafiltración, liofilización e inmovilización.

a) Cuantificación de la actividad enzimática

La actividad de esterasa se cuantificó por el método espectrofotométrico descrito por Nawani *et al.* (2006) utilizando como sustrato al *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL). Se adicionaron 0.8 mL de buffer de fosfato 0.05M (pH 7.5), 0.1 mL de enzima y 0.1 mL 0.01 M de *p*-NPL en etanol. La reacción se llevó a cabo a 37°C por 1 minuto, después se agregaron 0.250 mL de Na₂CO₃ 0.1 M para detener la reacción por precipitación del sustrato que no reaccionó. La mezcla se centrifugó a 14000 rpm (Centrifuga Eppendorf 5415 C) durante 10 min y se midió el cambio de

absorbancia a 420 nm (Spectronic 21D). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto bajo condiciones de ensayo a 37°C.

Se realizó una curva de calibración con un estándar de *p*-nitrofenol 1 $\mu\text{mol/ml}$, para calcular la cantidad de actividad enzimática que presentó tanto el extracto enzimático como la enzima inmovilizada (Apéndice 10.1).

b) Cuantificación de proteína

Se cuantificó la concentración de proteína soluble por medio del método de Bradford (1976) empleando como reactivo azul de Coomassie concentrado. El color generado se cuantificó espectrofotométricamente (Spectronic 21D) a una absorbancia de 595 nm.

Se realizó una curva de calibración con un estándar de seroalbúmina bovina (BSA) utilizando concentraciones dentro de un intervalo de 2 a 10 $\mu\text{g/mL}$ (Apéndice 10.2).

E. Acondicionamiento de la muestra

a) Ultrafiltración

Se ultrafiltró el extracto crudo en una celda con agitación (Amicon) usando una membrana YM con un límite de exclusión de 10 kDa a 4°C.

b) Liofilización

El extracto crudo ultrafiltrado se colocó en envases de plástico, se congeló con hielo seco y se mantuvo a -70°C . Se liofilizaron las muestras (liofilizador Labconco®) para concentrar el extracto por sublimación del agua y así evitar un daño significativo de la enzima. El liofilizado obtenido se resuspendió en un volumen de acuerdo a la concentración de proteína necesaria para los ensayos y se determinaron la cantidad de proteína y la actividad enzimática como se mencionó anteriormente.

F. Evaluación del perfil de proteína y zimogramas.

Con la finalidad de evaluar el perfil de proteínas del extracto crudo y durante el proceso de inmovilización se prepararon geles de electroforesis y zimogramas.

a) Electroforesis

Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) utilizando un gel concentrador al 4 % y un gel separador al 12 %. Se utilizó un marcador de bajo peso molecular que comprende un rango de 116 a 14.4 kDa (Fermentas) como referencia. Los geles se corrieron a 80 Volts y una vez que el frente llegó al gel separador se corrió a 120 Volts, en una cámara de electroforesis (Miniprotean II, BioRad).

La tinción se hizo con azul de Coomassie o plata, dependiendo de la concentración de proteína en la muestra.

Tinción con azul de Coomassie.

Para las muestras concentradas y desorbidas del soporte de inmovilización: una vez finalizada la electroforesis, el gel se sumergió en 20 mL de solución teñidora de azul de Coomassie durante toda la noche. Esta se retiró transcurrido este tiempo y se sustituyó por solución desteñidora, hasta eliminar el excedente de colorante y la aparición clara de las bandas de proteína.

Tinción con plata.

Se utilizó la tinción de plata para las muestras del extracto crudo. Se siguió el protocolo de tinción de máxima sensibilidad del Page Silver™ Silver Staining kit (Fermentas).

b) Zimogramas

La actividad esterasa se visualizó en zimogramas de acuerdo a la metodología descrita por Karpushova (2005) utilizando como sustrato α -naftil acetato. Se elaboraron geles SDS-PAGE siguiendo la metodología anteriormente descrita y se corrió en una cámara de electroforesis a 80 Volts. Una vez terminada la electroforesis, el gel se incubó en buffer de fosfatos 0.05 M, pH 7.5 durante 30 min, se cambió la solución por buffer de fosfatos 0.05 M, pH 7.5 con Tritón X-100 al 5 % y se dejó incubar por 30 min. Transcurrido el tiempo se reemplazó la solución anterior por buffer de fosfatos 0.05 M, pH 7.5 para incubar nuevamente

por 30 min. Con este tratamiento se logró la renaturalización de la enzima y la adquisición de una conformación activa.

Inmediatamente después se colocó el gel en una solución de α -naftil acetato (Solución A) la cual se incubó por 15 min a temperatura ambiente con agitación y, por último se colocó la solución de Fast Red TR (Solución B) como revelador y se incubó hasta el desarrollo de bandas de color marrón característico de la presencia de actividad esterasa.

Solución A: 5 mg de α -naftil acetato se disolvieron en 1.25 mL de acetona y se llevó a un volumen final de 12.5 mL con buffer de fosfatos 0.05 M pH 7.5.

Solución B: se pesó 12.5 mg de Fast Red TR, se adicionó 12 μ L de Triton X-100 y se llevó a un volumen final de 12.5 mL con buffer de fosfatos 0.05 M pH 7.5.

Se utilizó un densitómetro modelo GS 700 BioRad® y el programa Quantity-One® para determinar el peso molecular de las bandas en los geles de electroforesis.

G. Inmovilización

La inmovilización de las enzimas se realizó en un soporte hidrofóbico de polipropileno (Accurel MP 1000) siguiendo la metodología propuesta por Bosley y Peilow (1997).

a) Pretratamiento del soporte.

Se humedeció 1g de Accurel MP 1000 en etanol absoluto, que se cambió por una solución etanol:agua desionizada al 50 % y finalmente en agua desionizada; cada una de las etapas duró 30 min. Finalizada la última etapa, se eliminó el agua por filtración y el soporte se secó en una estufa a 37°C por toda la noche, para poder proceder a la adsorción.

El pretratamiento se hizo con la finalidad de incrementar la afinidad de las enzimas lipolíticas en solución por la superficie hidrofóbica del soporte (Gitlesen, *et al.*, 1997; Foresti y Ferreira, 2004).

b) Adsorción

Con base en la concentración de proteína (0.2 mg/mL), el extracto concentrado liofilizado se resuspendió previamente en buffer de fosfatos pH 7.5, 0.05 M.

El proceso de adsorción se comenzó al poner el soporte pretratado (1 g) en contacto con la solución de la enzima (50 mL), en un matraz. Se incubó por 3 h a 200 rpm y temperatura de refrigeración en una placa con agitación orbital (Lab-Line 3518 Instruments Inc.). El monitoreo del proceso de adsorción se siguió midiendo la cantidad de proteína y la actividad remanente en el sobrenadante. Al finalizar el tiempo de inmovilización, se lavó el biocatalizador con 100 mL de buffer de fosfatos (pH 7.5, 50 mM) y 100 mL de agua desionizada.

Finalmente, el biocatalizador se dejó secar en un desecador a temperatura de refrigeración por 24 h y se almacenó a temperatura de refrigeración.

c) Determinación de las condiciones de inmovilización

Se evaluaron las siguientes condiciones de inmovilización:

pH y temperatura de adsorción

Se realizó el proceso de adsorción por 24 h, utilizando una concentración del extracto de 0.2 mg/mL, con agitación orbital de 200 rpm y se evaluaron las siguientes combinaciones de pH y temperatura: pH 7.0 (buffer de fosfatos 50 mM) - 4°C; pH 8.0 (buffer TRIS 50 mM) – 4°C; pH 7.0 – 20°C y pH 8.0 – 20°C.

Tiempo de adsorción

Se realizó el proceso de adsorción a temperatura de refrigeración, concentración del extracto 0.2 mg/mL, agitación orbital de 200 rpm, buffer de fosfatos (pH 7.0, 50 mM) y se varió el tiempo de adsorción: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 5 h. El muestreo consistió en la interrupción del proceso de adsorción, donde se evaluaron la concentración de proteína y actividad residual del sobrenadante y del biocatalizador.

Concentración de proteína.

Se realizó el proceso de adsorción a temperatura de refrigeración, 3 h, agitación orbital de 200 rpm, buffer de fosfatos (pH 7.0, 50 mM) y se utilizaron concentraciones del extracto de 0.2 a 1 mg/mL.

Se midió la concentración de proteína residual en el sobrenadante y la enzima inmovilizada se guardó a 4°C.

H. Caracterización de la enzima inmovilizada y el extracto crudo.

a) Determinación de estabilidad térmica y al pH.

Estabilidad térmica.

Se prepararon varios tubos Eppendorf con una concentración de proteína 0.2 mg/mL en amortiguador de fosfatos 0.05 M, pH 7.0 y se incubaron a diferentes temperaturas desde 20 a 60°C durante 60 min. Después de la incubación se tomaron alícuotas de 100 μ L y se determinó la actividad residual a 37°C por el método espectrofotométrico anteriormente descrito.

Por otra parte, la enzima inmovilizada (5mg), se incubó bajo las mismas condiciones que se mencionaron para las enzimas en solución y transcurrido el tiempo de incubación se separó el sobrenadante para secar el biocatalizador por 12 h en un desecador a 4°C y poder determinar la actividad residual con *p*NPL como sustrato.

Estabilidad frente al pH

Se prepararon varios tubos Eppendorf con una concentración de proteína de 0.2 mg/mL y se llevó a un volumen total de 1 mL en cada uno de los diferentes amortiguadores a pH 5.0 (acetatos), 7.0 (fosfatos), 8.0- 9.0 (Tris) y 10.0 (CAPS), todos de concentración 0.05 M. Se incubaron a 4°C durante 24 h. Transcurrido el tiempo se determinó actividad residual por el método espectrofotométrico utilizando *p*-NPL como sustrato a 37°C.

Por otra parte, la enzima inmovilizada (5 mg), se incubó bajo las mismas condiciones que se mencionaron para las enzimas en solución y transcurrido el tiempo de incubación se separó el sobrenadante para secar el biocatalizador por 12 h en un desecador a 4°C y poder determinar la actividad con *p*-NPL espectrofotométricamente.

b) Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de la enzima

Efecto del pH

Se prepararon amortiguadores de pH 5 (acetatos), 7 (fosfatos), 8- 9 (Tris) y 10 (CAPS), todos de concentración 0.05 M. Se utilizó el método espectrofotométrico mencionado anteriormente, y el sustrato fue una disolución de *p*-NFL 0.01 M. La reacción se siguió durante 2 min.

Temperatura de actividad.

Se utilizó el método espectrofotométrico, el sustrato fue *p*-NPL, y se llevó a cabo la reacción a diferentes temperaturas desde 20 a 60°C.

c) Determinación de la especificidad por sustrato

Se cuantificó la actividad de esterasa el método espectrofotométrico siguiendo la metodología anteriormente mencionada, y los sustratos fueron: *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA), *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL), *p*-nitrofenil miristato (*p*-NPM), *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) y *p*-nitrofenil estearato (*p*-NPE). El cambio de absorbancia se midió a 420 nm y se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad

de enzima necesaria para liberar $1\mu\text{mol}$ de *p*-nitrofenol por minuto bajo condiciones de ensayo a 37°C .

En la figura 14 se muestran las reacciones de hidrólisis de los *p*-nitrofenil ésteres, que se llevan a cabo bajo las condiciones de trabajo mencionadas anteriormente:

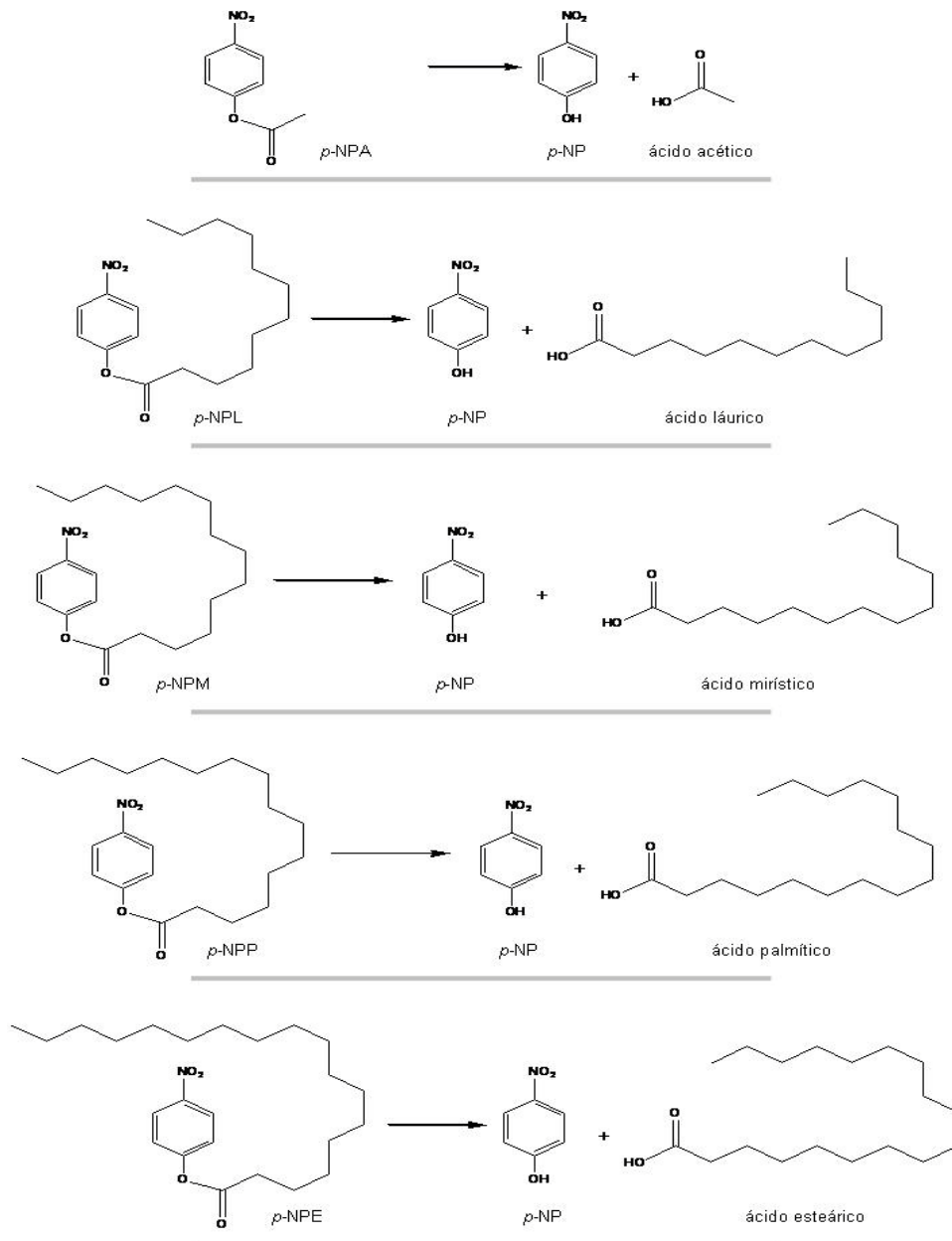


Fig.14: Reacciones de hidrólisis de los *p*-nitrofenil ésteres utilizados como sustrato para la determinación de la especificidad por sustrato.

I. Biotransformación del ácido kójico.

En cuatro viales de vidrio color ámbar con tapón de rosca de 8 mL se disolvieron 25 mg de dilaurato de ácido kójico en 1.25 mL de tolueno. A esta disolución se le agregó lentamente 3.75 mL de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.0 con la concentración de extracto crudo o de la enzima inmovilizada (40 U/mg proteína), a temperatura ambiente. El blanco se preparó únicamente con la disolución de dilaurato de ácido kójico, tolueno y buffer de fosfatos 50 mM pH 7.0.

Se dejó reaccionar durante 48 h a 37° con agitación orbital de 200 rpm (Innova 40, New Brunswick Scientific); pasado este tiempo se adicionaron lentamente 3 mL de acetato de etilo a cada uno de los viales y se separó la fase orgánica de la acuosa.

Se realizó la extracción del producto, se eliminó el disolvente por destilación a presión reducida (rotavapor Buchi R-205) y quedó un residuo color crema, el cual se purificó mediante cromatografía en capa preparativa con una mezcla hexano/acetato de etilo/diclorometano 7:2:1.

a) Purificación e identificación de los productos de reacción.

Se utilizó la cromatografía en capa fina (CCF) para la identificación del producto después de 48 h de reacción, utilizando cromatoplasmas de sílica gel G/UV₂₅₄ 20 x 20 cm y 0.2 mm de espesor. Se utilizó la cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) para la purificación del producto de reacción utilizando cromatoplasmas preparativas de sílice gel G/UV₂₅₄ 20 x 20 y 1.0 mm de espesor.

La visualización de los componentes de cada placa cromatográfica se llevó a cabo mediante la exposición a la luz ultravioleta proveniente de una lámpara portátil (Camag 254 – 365 nm) y posterior revelado por aspersion sobre la placa cromatográfica con una disolución de sulfato cérico y DPPH.

Los datos espectroscópicos de RMN – ^1H y RMN – ^{13}C se obtuvieron en equipos Varian VXR-300S operado a 400 MHz (^1H) y 100 MHz (^{13}C); utilizando como disolvente el CDCl_3 . Las estructuras se identificaron por comparación directa de las propiedades espectrales (Apéndice 10.3).

6. Resultados y discusión

6.1. Producción de la enzima

La producción de las esterases se llevó a cabo en un medio optimizado basado en la formulación del medio mínimo descrito por Käfer (1977), el cual fue optimizado por Peña-Montes (2001) y Castro-Ochoa (comunicación personal), el cual contenía 0.5 % de sacarosa como fuente de carbono, 0.5 % de extracto de levadura como fuente de nitrógeno y aceite de olivo como inductor, a un pH de 6.5, 37°C, 350 rpm y 24 h de fermentación.

Como ha sido estudiado por algunos autores, la producción de enzimas extracelulares, como el caso de la proteasa PrtA de *A. nidulans* reportado por Katz *et al.* (2000), está sujeta a mecanismos de regulación determinados por las condiciones nutrimentales del medio (represión catabólica por fuente de carbono, nitrógeno, azufre y control de pH). Por lo tanto, hay una fuerte relación entre los componentes del medio de cultivo y la secreción de enzimas en una fermentación (Cohen, 1973; Katz *et al.*, 2000).

El medio descrito por Peña-Montes (2001) contenía almidón al 0.5 %. Sin embargo se presentaban problemas para el tratamiento de la muestra durante el proceso de ultrafiltración, por lo tanto la fuente de carbono fue sustituida por sacarosa, donde se observó la presencia de varias enzimas con actividad esterasa (Castro-Ochoa, comunicación personal).

Se trabajó con el medio optimizado con sacarosa, a partir del cual se obtuvo por filtración del micelio el extracto crudo, el cual se evaluó su perfil de proteínas realizando geles de acrilamida al 12%, los cuales se tiñeron con azul de Coomasi y se analizaron en un densitómetro utilizando el programa Quantity-One en el cual de forma automatizada se puede determinar el peso molecular de las distintas bandas presentes en la muestra. Se observa la producción de proteínas extracelulares (Fig.15), dentro de las cuales se encuentran una proteína con actividad de esterasa que corresponden a una bandas con masa molecular de 29

kDa la cual codifica para una cutinasa, y otra banda de ~ 25 kDa con actividad de esterasa que es un producto de degradación de la de 29 kDa (Gene Bank numero de acceso: ABF50887), lo cual ha sido reportado por Peña-Montes (2001) y Castro-Ochoa (comunicación personal).

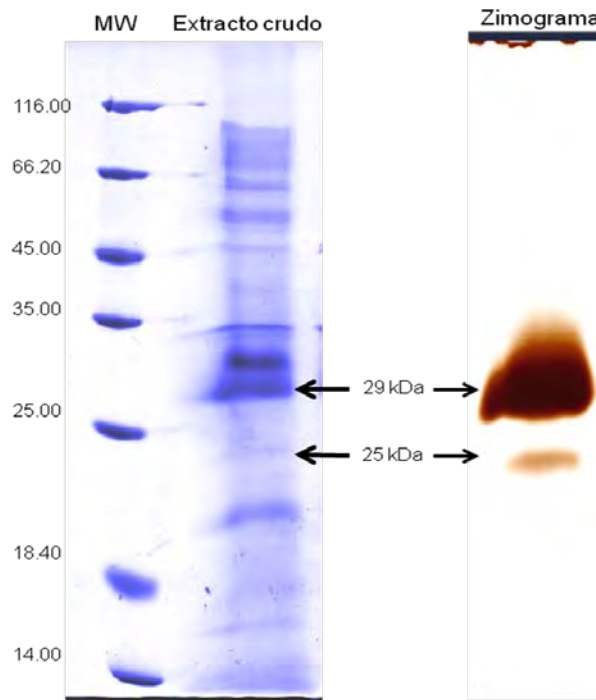


Fig. 15: Evaluación del perfil de proteínas del extracto crudo de *A. nidulans* PW1 en medio optimizado con sacarosa. SDS-PAGE (12 %) teñido con azul de Coomassie y zimograma.

6.2. Inmovilización

A. Determinación de las condiciones de inmovilización

pH y temperatura de inmovilización.

Se evaluó el efecto del pH y la temperatura en el proceso de inmovilización de las enzimas con actividad esterasa a partir del extracto concentrado de *A. nidulans* a temperaturas de 4 y 20°C y a valores de pH de 7.0 y 8.0. Se estudiaron las combinaciones: 4°C y pH 7.0, 4°C y pH 8.0, 20°C y pH 7.0, y 20°C y pH 8.0, las cuales se incubaron a 200 rpm durante 24h y finalmente se determinó la actividad de esterasa de la enzima inmovilizada, utilizando *p*-nitrofenil laurato como sustrato, obteniéndose los siguientes resultados de la Tabla 11:

Tabla 11: Actividad de esterasa después de inmovilizar a diferentes valores de pH y temperatura.

Temperatura	4°C		20°C		Actividad
pH	7.0	8.0	7.0	8.0	
Inmovilizado	1.95	1.47	1.27	0.47	U/g soporte
	21.19	15.98	13.8	5.1	U/mg proteína

Gitlese *et al.* (1997), sugiere que debido a la naturaleza hidrofóbica y no iónica del polipropileno (Accurel), la adsorción de las proteínas a este soporte están gobernadas por las interacciones hidrofóbicas.

El efecto que tiene el pH sobre el proceso de inmovilización se refleja en la carga electrostática que adquiere la proteína, la cual se adsorbe en mayor proporción al encontrarse cerca de su punto isoeléctrico, ya que se ven disminuidos los efectos de repulsión y se favorecen las interacciones hidrofóbicas entre la enzima y el soporte (Gonçalves *et al.* 1997).

La temperatura también influye en la cinética de adsorción, principalmente cuando se trabaja con soportes porosos, en los cuales se presentará resistencia a la difusión intramolecular adicional a la resistencia impartida sólo por el soporte (Paiva *et al.* 2000). Sin embargo, en este caso se observa que el proceso de adsorción de la enzima al soporte es favorecido a 4°C y pH 7.0, condiciones en las que la enzima inmovilizada presenta el valor de actividad esterasa más alto, considerando que la actividad inicial del extracto antes de inmovilizar fue de 13.22 ± 1.45 U/mg proteína. Por otra parte, las enzimas son más estables a esta temperatura durante la inmovilización. Por lo tanto se convino trabajar bajo estas condiciones para los siguientes ensayos.

Tiempo de inmovilización.

La elección del tiempo de contacto entre la enzima y el soporte es un parámetro importante a estudiar; por lo tanto, se determinó el tiempo incubación, construyendo una curva de adsorción de las esterases al soporte a las condiciones de pH 7, temperatura a 4°C y 200 rpm. Se hizo el seguimiento de la cinética de adsorción midiendo la actividad residual y la concentración de proteína libre en el sobrenadante (Fig. 16), se muestran los datos en la Tabla 12:

Tabla 12: Actividad residual y concentración de proteína libre en sobrenadante.

Tiempo (min)	Concentración de proteína (mg/mL)	Proteína residual (%)	Actividad enzimática (U/mL)	Actividad residual (%)
0	0.174	100	31.233	100
15	0.185	100	9.424	30
30	0.171	98	5.937	19
45	0.166	95	4.772	15
60	0.158	91	3.945	13
300	0.153	88	5.547	18

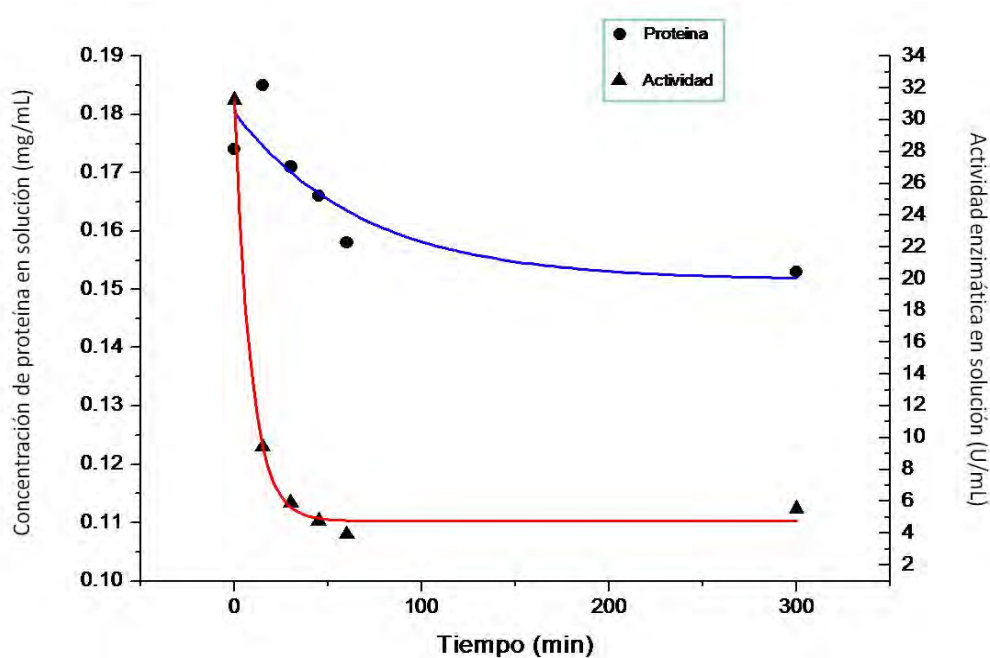


Fig. 16: Adsorción de las esterases de *A. nidulans* PW1 en Accurel MP-1000. La concentración de proteína (-●-) y actividad de esterasa (-▲-) fue medida en el sobrenadante. La adsorción se realizó a pH 7, 4°C, 200 rpm.

Se observa una tendencia de disminución a la par de los valores de actividad y proteína en el sobrenadante y se apreció una pérdida del 70% de actividad esterasa a los 15 min de incubación, lo cual indica una adsorción rápida de las

enzimas con actividad esterasa al soporte, por lo que no es necesario incubar por tiempos de 24 h.

Este comportamiento ha sido observado por otros autores como Almeida *et al.* (2008) al llevar a cabo la inmovilización de esterasa de *Pyrococcus furiosus* en Accurel MP 1000 y observar una pérdida de actividad del 90% después de 15 min; por Gitlesen *et al.* (1997) con la inmovilización de la EST/LIP de *Candida rugosa* con una reducción de actividad del 70% a los 10 min; y por Gupta *et al.* (2005) al reportar una pérdida de actividad del 58% a los 15 minutos de la inmovilización de la lipasa de *Burkholderia multivorans* en Accurel MP-1000. Todos estos son casos en los que se reporta una rápida adsorción de las enzimas por la afinidad de éstas al soporte debido a las interacciones hidrofóbicas que se establecen.

También se observa que después de 1 h de incubación la curva tiene un comportamiento constante, lo que indicaría que se alcanza un equilibrio entre el fenómeno de adsorción/desorción que se da entre las enzimas del extracto de *A. nidulans* y el soporte, fenómeno también reportado por otros autores anteriormente mencionados (Gitlesen *et al.*, 1997; Gupta *et al.*, 2005; Almeida, *et al.*, 2008).

Se realizó la evaluación del perfil electroforético en geles de SDS-PAGE y zimogramas del proceso de inmovilización con respecto al tiempo para determinar si alguna actividad o proteína se adsorbe preferencialmente (Fig.17).

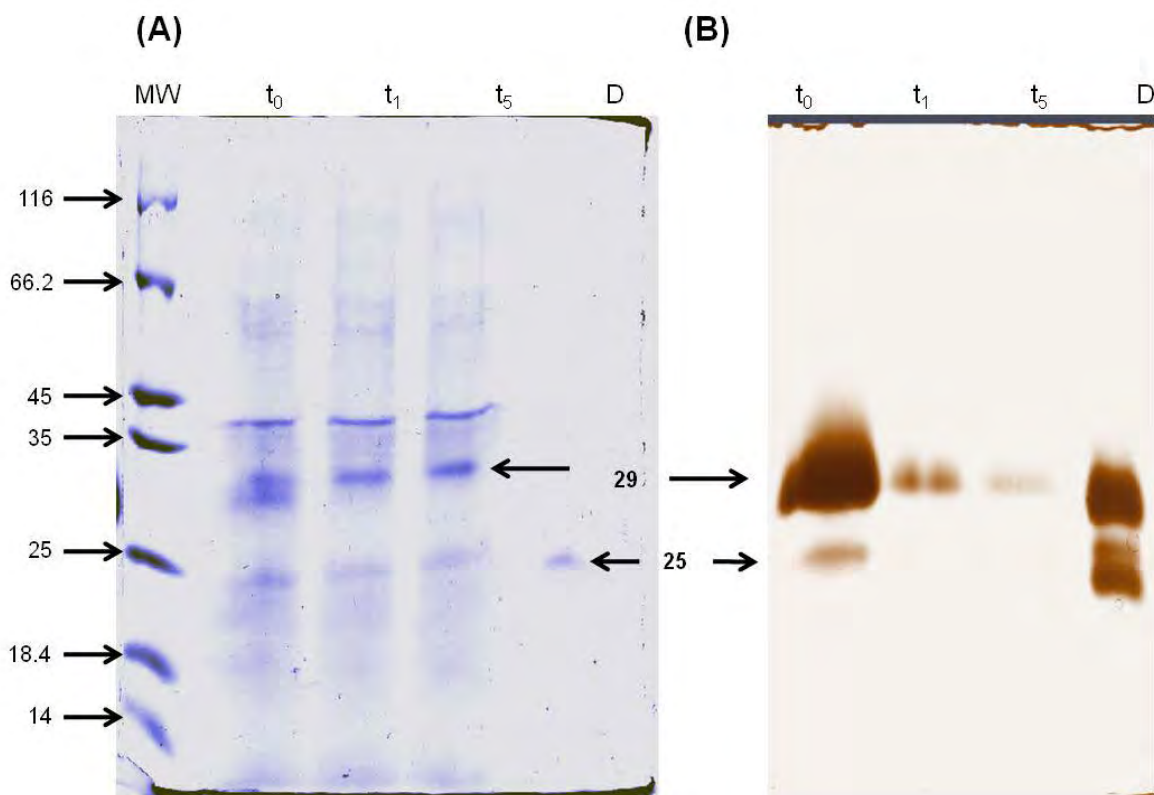


Fig. 17: Evaluación del perfil de proteínas durante el proceso de inmovilización: (A) SDS-PAGE (12%) teñido con azul de Coomassie; (B) Zimograma.; MW: marcador de pesos moleculares (kDa); t₀: concentrado enzimático antes de inmovilizar, t₁: sobrenadante a 1 h de inmovilización, t₅: sobrenadante a 5 h de inmovilización, D: desorción.

Del zimograma se puede observar la disminución de la actividad de esterasa en el sobrenadante con respecto al tiempo, confirmando los resultados anteriores. Además, este comportamiento puede ser un indicador de que la adsorción de las enzimas con actividad de esterasa tienen mayor afinidad al soporte, lo cual ha sido reportado por algunos autores (Bastida *et al.*, 1997; Al-Duri y Yong, 2000; Gupta *et al.*, 2005; Almeida, *et al.*, 2008) como una metodología para la purificación de las enzimas lipolíticas debido a la adsorción selectiva de éstas a un soporte de superficie hidrofóbica y donde se espera que el resto de las proteínas e impurezas permanezcan en solución.

En el carril que corresponde a la muestra que se desorbió del soporte utilizando Triton X-100 al 0.4%, a 4°C, durante 24 h, se observa en el zimograma la actividad esterasa de las proteínas de 29 y 25 kDa lo cual nos puede indicar una adsorción favorable de ambas enzimas; también se observa mayor intensidad de la cutinasa de menor peso lo que podría indicarnos que se puede estar dando un efecto de concentración de ésta.

Concentración de proteína.

En el caso de la concentración de proteína, se evaluaron concentraciones que van de 0.2 hasta 1 mg/mL, bajo las condiciones de pH 7.0, temperatura 4°C, 200 rpm por 6 h (Fig.18).

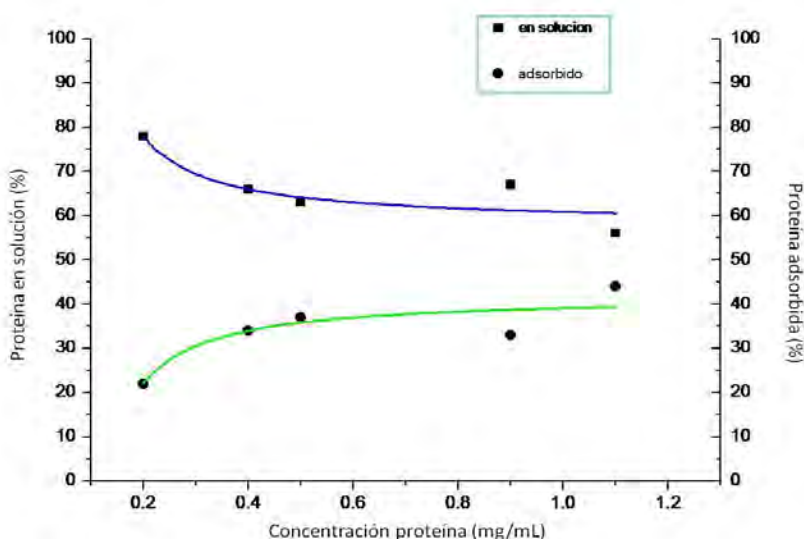


Fig. 18: Adsorción de las esterases de *A. nidulans* PW1 utilizando diferentes concentraciones iniciales de proteína. Proceso de adsorción a pH 7.0, 4°C, 200 rpm, 6 h. Porcentaje de proteína en solución (-■-) y porcentaje de proteína adsorbida (-●-).

Los resultados indican que a concentraciones mayores a 0.4 mg/mL de proteína la curva se vuelve asintótica, donde ya no se observa adsorción de proteína al soporte, por lo que se prefiere trabajar a concentraciones de proteína de 0.2 mg/mL proteína para evitar la saturación y/o agregación de la superficie del soporte.

Con base en los resultados anteriores las condiciones de trabajo para la inmovilización de las esterasas a partir de un extracto concentrado de *A.nidulans* PW1 al soporte Accurel MP 1000 son las que se mencionan a continuación en la Tabla 13:

Tabla 13: Parámetros determinados para la adsorción de las esterasas de *A. nidulans* PW1 a partir de un extracto crudo sobre Accurel MP 1000.

Condiciones de la enzima para su inmovilización		Condiciones del soporte para la inmovilización de la enzima	
Parámetro	Valor obtenido	Parámetro	Condiciones de trabajo
Concentración de proteína	0.2 mg/mL	Naturaleza	Hidrofóbica
Valor de pH de la solución	pH 7.0	Peso (para la concentración de enzima)	1 g
Temperatura de inmovilización	4°C		
Fuerza iónica	50 mM	Pretratamiento	30 min EtOH 100%
Agitación	200 rpm		30 min EtOH/ H ₂ O (1:1)
Tiempo	3 h		30 min H ₂ O desionizada

B. Caracterización de la enzima inmovilizada y el extracto crudo

a) Determinación de estabilidad térmica y al pH

Se evaluó la estabilidad térmica de la enzima inmovilizada y de las enzimas en solución del extracto, incubando a temperaturas desde 20 a 60°C, a un valor de pH 7 durante 1h. Posteriormente se calculó la actividad esterasa residual con *p*-NPL (Fig. 19). En el caso de estabilidad a pH, se incubaron a valores de pH de 5 a 10 por 24 h a 4°C, se calculó la actividad residual (Fig.20).

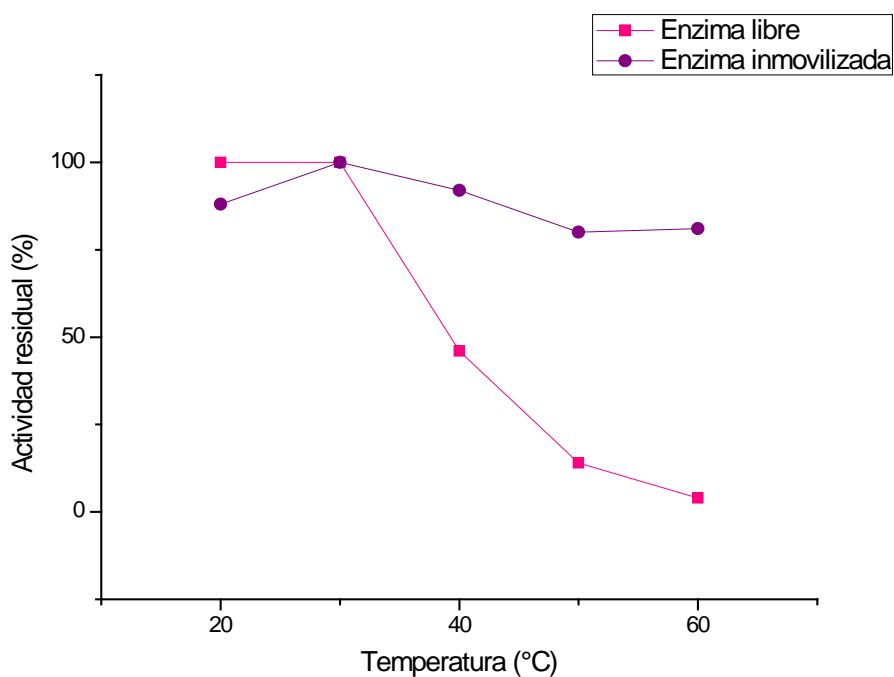


Fig. 19: Termoestabilidad de las enzimas en solución (-●-) y de las enzimas inmovilizadas (-■-) después de 1 h de incubación.

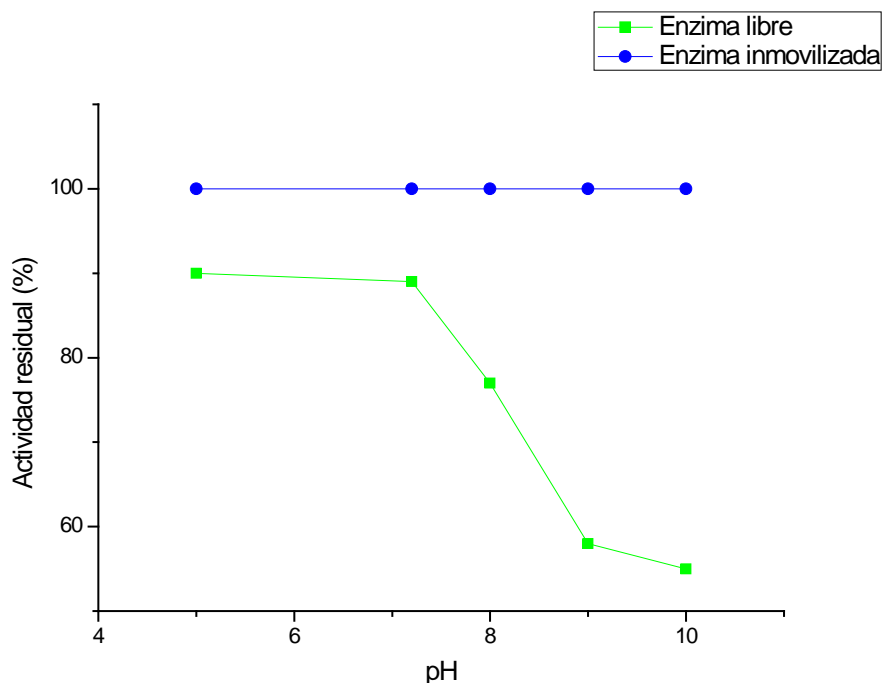


Fig. 20: Efecto del pH en la estabilidad de las enzimas sin inmovilizar (-●-) y de las enzimas inmovilizadas (-■-), después de 24 h de incubación a 4°C.

En la figura 19, se aprecia el efecto de inactivación por temperatura en las enzimas en solución observa después de 1 h a temperaturas superiores a 40°C; mientras que para el caso de las enzimas inmovilizadas de *A. nidulans* PW1 se observa un efecto estabilizador debido a la interacción de la enzima con el soporte ya que se mantiene casi constante la actividad. Se mantuvo el 80% de la actividad de la enzima inmovilizada al ser incubada a 60°C durante 1 h, a diferencia de las enzimas en solución que presentan una inactivación total.

En cuanto a la estabilidad al pH para el caso de las enzimas en solución, dentro de un rango de valores de pH entre 5.0 y 7.0 se observó que es estable, y a pH mayores hay un decaimiento de la estabilidad. Mientras que para el caso de la enzima inmovilizada, la actividad permanece constante mostrando estabilidad a los diferentes valores de pH con los que se trabajó.

Los resultados concuerdan con lo que ha sido reportado, al adquirirse una mayor estabilidad en la enzima inmovilizada que su contraparte en solución, La estabilidad se adquiere por efecto de la unión de las enzimas con actividad esterasa al soporte de Accurel MP 1000. Se sugiere que la enzima adquiere una conformación restringida que impide la desnaturalización de la enzima y por consiguiente se evita la pérdida de las propiedades catalíticas de ésta (Mateo *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2008; Sánchez-Otero *et al.*, 2008).

b) Efecto del pH y temperatura sobre la actividad enzimática

La evaluación de la actividad a diferentes valores de pH para las enzimas en solución y la enzima inmovilizada, se realizó con valores de pH entre 5 y 10 (Fig. 21); y para el caso de la temperatura se evaluó en un rango de 20 a 60°C (Fig. 22).

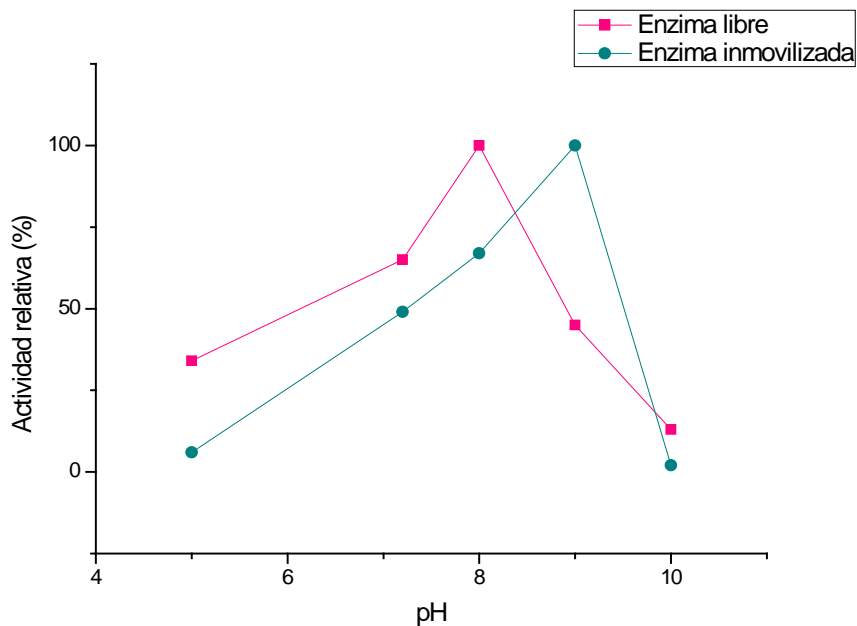


Fig. 21: Efecto del pH en la actividad de las enzimas en solución (-■-) y de las enzimas inmovilizadas (-●-) de *A. nidulans* PW1.

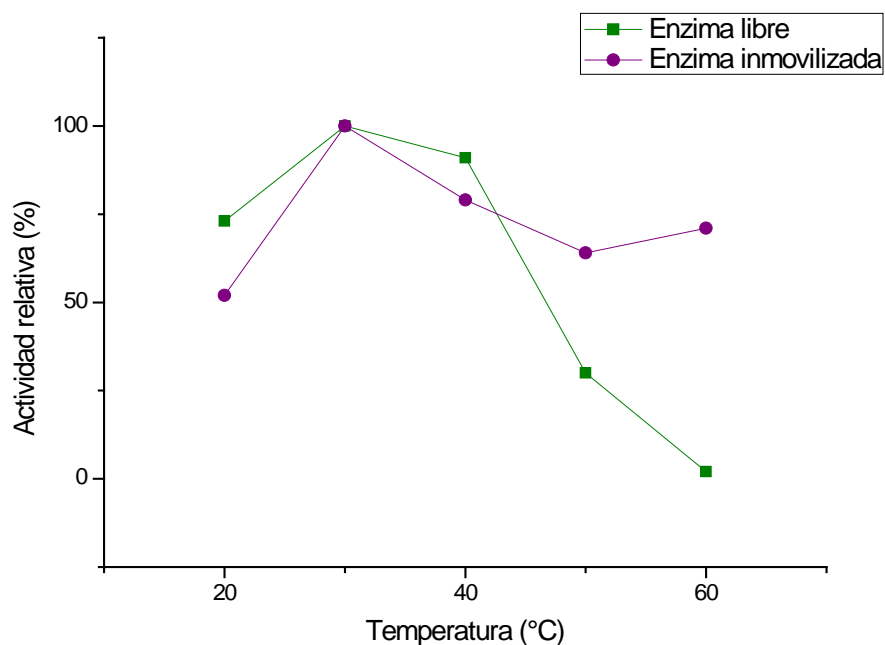


Fig. 22: Efecto de la temperatura sobre la actividad de esterasa del extracto crudo (-■-) y de la enzima inmovilizada (-●-) de *A. nidulans* PW1.

La actividad hidrolítica es mayor a valores de pH 8.0 para el caso de la enzima en solución y pH 9.0 para la enzima inmovilizada. Y el efecto de la temperatura sobre la actividad de esterasa para ambos casos, es de 30°C, temperatura a la cual se observa el mayor porcentaje de actividad. Se puede observar que para el caso del extracto enzimático hay una desnaturalización completa a 60°C por consiguiente una pérdida total de la actividad.

El efecto del pH en la actividad de una enzima ya sea en solución o inmovilizada es importante ya que las interacciones electrostáticas están determinadas por el valor de pH y la actividad se va a ver afectada por el estado de protonación de los residuos del sitio activo, por lo tanto éste es un factor clave (Neves *et al.*, 2001).

c) Determinación de la especificidad de sustrato.

Se evaluó la capacidad de hidrólisis de la enzima en solución así como inmovilizada, sobre ésteres de *p*-nitrofenilo con diferente largo de cadena, a pH 7.5 y 37°C por 1 min (Fig. 23)

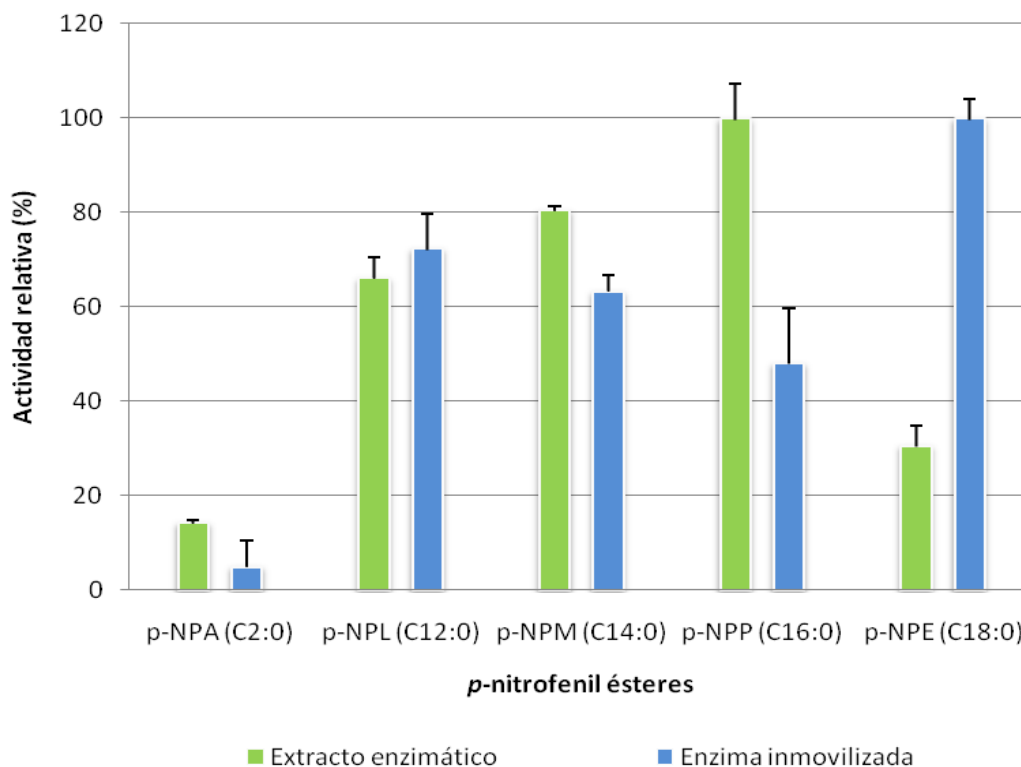


Fig. 23: Actividad de las enzimas solubles (■) e inmovilizadas (■) sobre ésteres de *p*-nitrofenilo con diferentes largos de cadena.

Se encontró que hay una mayor afinidad hacia sustratos de cadena larga ya que la actividad relativa para la hidrólisis del *p*-NPA es menor al 20%, el cual es un comportamiento esperado para cutinasas que presentan mayor afinidad hacia sustratos insolubles (Yang-Hoon *et al.* 2003; Degani *et al.*, 2005).

Se observó mayor actividad relativa del extracto por el palmitato de *p*-nitrofenilo (C16:0), mientras que para el caso de la enzima inmovilizada la afinidad es mayor por el sustrato estearato de *p*-nitrofenilo (C18:0).

6.3. Biotransformación del ácido kójico

Se evaluó la capacidad de llevar a cabo la reacción de hidrólisis de uno de los enlaces éster de la molécula de dilaurato de ácido kójico por parte de la enzima libre en el extracto crudo y de la enzima inmovilizada para generar un compuesto bioactivo.

Los productos de reacción se muestran en las placas de CCF en las imágenes de la figura 24:

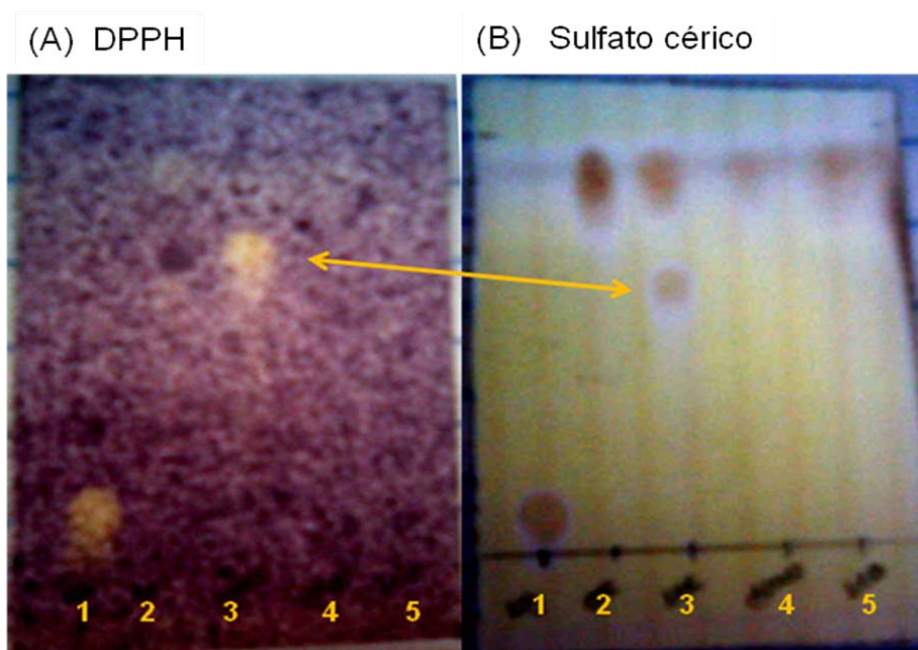


Fig.24 : Evaluación de la reacción de hidrólisis del dilaurato de ácido kójico por CCF: (

A): Placa revelada con DPPH; (B) Placa revelada con sulfato cérico;

(1): Ácido kójico (estándar); (2): Producto de reacción con enzima libre del extracto enzimático; (3):

Productos de reacción con enzima inmovilizada; (4): Control (reacción sin adición de enzima); (5):

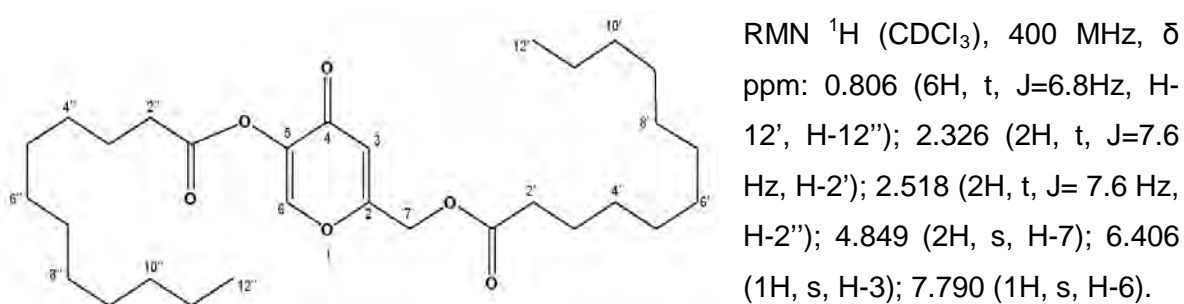
Dilaurato de ácido kójico (estándar).

La figura 24 muestra que la reacción de hidrólisis esperada se llevó a cabo en la muestra de reacción con la enzima inmovilizada de manera selectiva ya que se observó la recuperación de la actividad antioxidante de la molécula al revelarse la

placa cromatográfica con el ion DPPH. Se ha reportado por Ho Sik Rho *et al.* (2007) que la desacetilación en la posición del C-5 es la responsable de la recuperación de la actividad antioxidante por el grupo hidroxilo resultante de la reacción de hidrólisis. Mientras que la posición del C-7, al no presentar actividad biológica potencial puede favorecer en el carácter hidrofílico – hidrofóbico del compuesto cuando se encuentra sustituida por alguna cadena proveniente de algún ácido graso.

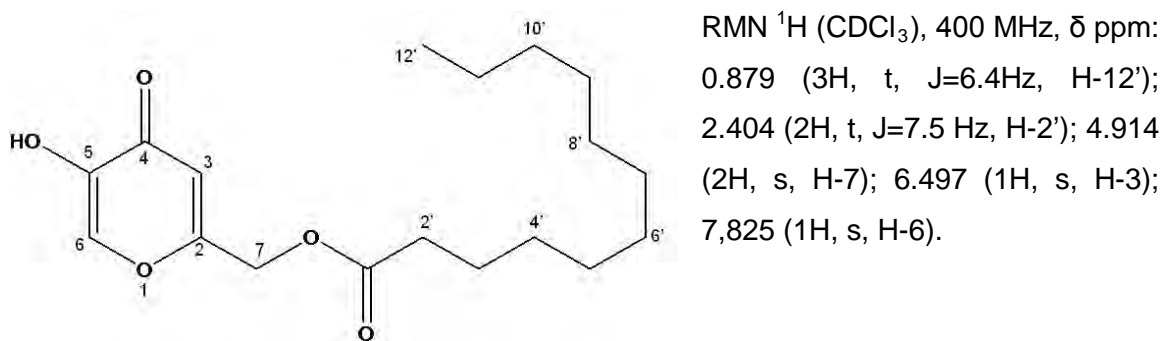
En este caso se vió favorecido el carácter hidrofóbico de la molécula en cuestión por la presencia de un éster de ácido láurico en la posición del C-7. Éste resultado se corroboró al evaluar por RMN el producto de reacción de hidrólisis del dilaurato de ácido kójico llevada a cabo por la enzima inmovilizada, con un rendimiento de 21.22%

Del análisis del producto de reacción y del sustrato en base a los datos espectroscópicos de RMN-¹H y RMN-¹³C se obtuvieron los datos que se encuentran en las figuras 25 y 26.



RMN ¹³C (CDCl₃), 100 MHz, δ ppm: 14.082 (C-12' y C-12''); 60.722 (C-7); 115.061 (C-3); 141.241 (C-6); 147.716 (C-5); 162.456 (C-2); 170.650 (C-4); 172.446 (C-1' y C-1'').

Fig. 25: Dilaurato de ácido kójico.



RMN ¹³C (CDCl₃), 100 MHz, δ ppm: 14.06 (C-12'); 61.099 (C-7); 110.880 (C-3);
 137.563 (C-6); 145.712 (C-5); 163.085 (C-2); 172.650 (C-1'); 180.058 (C-4).

Fig. 26: Monolaurato de ácido lójico

Los datos espectroscópicos se corroboraron con los datos del homólogo inferior de diez átomos de carbono (monodecanoato de ácido lójico) reportados por Raku y Tokiwa (2003).

Se puede observar en el espectro de RMN-¹H que la señal en δ 0.806 ppm asignada al protón del metilo en la cadena de laurato de la posición C-5 del anillo desaparece, así como también la señal en δ 2.518 ppm asignado al protón del metileno unido al carbonilo del éster. Este comportamiento confirma la reacción de hidrólisis del enlace éster del dilaurato de ácido lójico con la liberación de un ácido láurico.

En el espectro de RMN-¹³C se observa también la pérdida de dos señales, una en δ 14.06 ppm y otra en δ 172.650 ppm, las cuales fueron asignadas al grupo metilo y al grupo carbonilo del ácido láurico respectivamente, confirmando la pérdida de este ácido en el sustrato inicial.

Es importante mencionar que con la enzima libre al tiempo de 48 h no se observó la hidrólisis de este compuesto, mientras que con la enzima inmovilizada obtenida a lo largo del desarrollo de este trabajo se logró obtener un compuesto bioactivo lipofilizado, el cual resultaría de interés en la industria alimentaria y farmacéutica.

7. Conclusiones

- Se inmovilizaron las cutinasa con peso molecular de 29 kDa y 25 KDa con actividad esterasa a partir del extracto crudo de *Apergillus nidulans* PW1 sobre el soporte hidrofóbico Accurel MP 1000 utilizando las siguientes condiciones: concentraciones de proteína de 0.2 mg/mL, pH 7.0, 4°C y 200 rpm durante 3 horas.
- La enzima inmovilizada obtenida presenta una mayor estabilidad con respecto al extracto crudo. Esto ocurre tanto al incubar en buffers con diferentes valores de pH (100% de actividad después de ser incubada 24 h a 4°C), como tras incubar a diferentes temperaturas (80% de actividad después de 1h de incubación a 60°C) , con respecto al extracto crudo.
- El pH óptimo de actividad que presentó el extracto crudo es a un valor de 8.0, mientras que para el caso de la enzima inmovilizada se observó a 9.0.
- La temperatura óptima de actividad para el caso del extracto crudo como para la enzima inmovilizada se presentó a 30°C.
- El extracto crudo al ser incubada a 60°C durante 1 h se presenta una desactivación casi total de la enzima. Mientras que para la enzima inmovilizada no se observó desactivación bajo las mismas condiciones.
- La enzima inmovilizada llevó a cabo la reacción de hidrólisis del enlace éster de la molécula de dilaurato de ácido kójico en la posición C-5, con la consecuente recuperación de la actividad antioxidante, generando un compuesto bioactivo lipofilizado.

8. Perspectivas

- Optimizar las condiciones de la reacción de hidrólisis del dilaurato de ácido kójico para incrementar el rendimiento.
- Evaluar la capacidad antioxidante del producto de hidrólisis del dilaurato de ácido kójico y su aplicación en alimentos.
- Hacer un seguimiento cuantitativo de la reacción de hidrólisis para conocer la eficiencia de la reacción.
- Evaluar la capacidad de este catalizador para hidrólisis de otros sustratos con actividad biológica como flavonoides, ácidos hidroxicinámicos, triterpenos, fenoles, entre otros.

9. Bibliografía

- **Aehle W.** (2004) Enzymes in Industry: production and applications. 2° ed. Wiley – VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim. pp.1 – 7, 172 – 174, 257 – 262.
- **Al-Duri B., Yong Y.P.** (2000). Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. *Biochemical Engineering Journal*. **4**: 207 – 215.
- **Almeida R.V., Branco V.R., Peixoto B., da Silva L.C., Campbell A.S.M., Martins O.B., Ceva A.O.A., Guimaraes F.D.M.** (2008). Immobilization of a recombinant thermostable esterase (*Pf2001*) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: isotherms, hyperactivation and purification. *Biochemical Engineering Journal*. **39**: 531 – 537.
- **An Zhiqiang.** (2005). Handbook of Industrial Mycology. Vol. 22. Marcel Dekker. New York. pp. 493 – 514.
- **Arroyo M.** (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*. **39(2)**: 23 – 39.
- **Ballesteros N.** (2006). Caracterización de la esterasa de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis. Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- **Bastida A., Sabuquillo P., Armisen P., Fernández-Lafuente R., Huguet J., Guisán J.M.** (1998). A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and Bioengineering*. **58(5)**: 486 – 493.
- **Beélik A.** (1956). Kojic Acid. *Advances in Carbohydrate Chemistry*. **11 (4)**: 145 – 183.
- **Bickerstaff G.F.** (1997). Immobilization of enzymes and cells. Vol. 1. New Jersey. Human Press Inc. pp. 1 – 10.
- **Birkinshaw J.H., Charles J.H.V., Lilly C.H., Raistrick H.** (1931) Kojic acid (5-Hydroxy-2-hydroxymethyl- γ -pyrone). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Containing Papers of a Biological Character. Studies in the Biochemistry of Micro-Organisms*. **220**: 127 – 367.
- **Bommarius A.** (2004). Biocatalysis. Wiley - VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim. pp. 1 – 15, 30, 31.

- **Borreguero I., Carvalho C.M.L., Cabral J.M.S., Sinisterra J.V., Alcántara A.R.** (2001) Enantioselective properties of *Fusarium solani pisi* cutinase on transesterification of a cyclic diols: activity and stability evaluation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **11**: 613 – 622.
- **Bornscheuer U.T., Kazlauska R.J.** (2006) *Hydrolases in organic synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*. 2° ed. Wiley - VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim. pp. 61 – 74.
- **Bornscheuer U.T.** (2002) Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. *Current Opinion in Biotechnology* **13**: 543 – 547
- **Bosley J.A., Peilow A.D.** (1997). Immobilization of lipases on porous polypropylene: reduction in esterification efficiency at low loading. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **74**: 107 – 111.
- **Bradford M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248 – 254.
- **Burdock G.A., Soni M.G., Carabin I.G.** (2001). Evaluation of health aspects of kojic acid in food. *Regulatory toxicology and Pharmacology*. **33**: 80 – 101.
- **Camps P., Vázquez S., Escolano C.** (2005). *Fundamentos de síntesis de fármacos*. Textos docents:294. La Universitat de Barcelona. pp: 78 - 80
- **Cao Linqiu.** (2005). *Carrier-bound Immobilized Enzymes: principles, applications and design*. Wiley – VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim. pp. 1 – 4, 53 – 60.
- **Carvalho C.M.L., Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S.** (1998). Cutinase structure, function and biocatalytic applications. *Electronic Journal of Biotechnology*. **1 (3)**: 160 – 173.
- **Carvalho C.M. L., Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S.** (1999). Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnology and Bioengineering*. **66**: 17-34.
- **Chebil L., Humeau C., Falcimaigne A., Engaser J.M., Ghouil M.** (2006). Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochemistry*. **41**: 2237 – 2251.

- **Chen J.C., Tsai S.W.** (2000). Enantioselective synthesis of (S)-Ibuprofen ester prodrug in cyclohexane by *Candida rugosa* lipase immobilized on A currel MP 1000. *Biotechnology Progress*. **16**: 986 – 992.
- **Cohen B.L.** (1973). Regulation of intracellular and extracellular neutral and alkaline proteases in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*. **79**: 311 – 320.
- **Da Silva C.F., Contesiniand F.J., Carvalho P.O.** (2008). Characterization and catalytic activity of free and immobilized lipase from *Aspergillus niger*: a comparative study. *Journal of Bazilian Chemical Society*. **19 (8)**: 1468 – 1474.
- **De Oliveira D., Feihmann A.C., Dariva C., Cuhna A.G., Bevilaqua J.V., Destain J., Oliveira J.V., Freire D.M.G.** (2006). Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **39**: 117 – 123.
- **Degani O., Slman H., Gepstein S., Doseretz C.G.** (2005). Synthesis and characterization of a new cutinase substrate, 4-nitrophenyl (16-methyl sulfone ester) hexadecanoate. *Journal of Biotechnology*. **121**: 346 – 350.
- **Derewenda U., Swenson L., Wei Y., Green R., Kobos P., Joerger R., Haas M.J., Derewenda Z.S.** (1994). Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginose* and *Rhizopus delemar*. *Journal of Lipid Research*. **35**: 524 – 534.
- **Dutta K., Sen S., Veeranki V.D.** (2009). Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochemistry*. **44**: 127 – 134.
- **Fojan P., Jonson P.H., Petersen M.T.N, Petersen S.B.** (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie* **82**: 1033 – 1041.
- **Fontes Pio T., Alves G.** (2009). Cutinases: properties and industrial applications. *Advances in Applied Microbiology*. **66**: 77 – 95.
- **Foresti M.L., Ferreira M.L.** (2004). Ethanol pretreatment effect and particle diameter issues on the adsorption of *Candida rugosa* lipase onto polypropylene powder. *Applied Surface Science*. **238**: 86-90.

- **Galagan J.E., Calvo S.E., Cuomo C., Ma L., Wortman J.R., Batzoglou S., Lee S., Bastürkmen M., Spevak C.C., Clutterbuck J., Kapitonov V., Kurka J., Scazzocchio C., Farman M., Butler J., Purcell S., Harris S., Braus G.H., Draht O., Busch S., D'Enfert C., Bouchier C., Goldman G.H., Bell-Pedersen D., GriffithsJones S., Doonan J.H., Yu J., Vienken K., Pain A., Freitag M., Selker E.U., Archer D.B., Peñalva M.A., Oakley B.R., Momany M., Tanaka T., Kumagai T., Asai K., Machida M., Nierman W.C., Denning D.W., Caddick M., Hynes M., Paoletti M., Fischer R., Miller B., Dyer P., Sachs M.S. Osmani S.A., Birren B.W.** (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigates* and *A. oryzae*. *Nature*. **438**: 1105 – 1115.
- **Ganesh K.A., Swarnalath S., Kamatchi P. Kirubagaran R., Perinbam K., Sekaran G.** (2008). Immobilization of proteolytic enzyme on highly porous activated carbon derived from rice brand. *Journal of Porous Materials*. **4 (16)**: 439 – 445.
- **García-Lepe R., Nuero O.M., Reyes F., Santamaría F.** (1997) Lipases in autolysed cultures of filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* **25**: 127 – 130.
- **Gitlesen T., Bauer M., Adlercreutz P.** (1997). Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1345**: 188 – 196.
- **Gonzalez-Navarro H., Ba M.C., Abad C.** (2001). The closed/open model for lipase activation. Addressing intermediate active forms of fungal enzymes by trapping of conformers in water-restricted environments. *Biochemistry* **40**: 3174 – 3183.
- **Gonçalves A.P.V., Lopes J.M., Ramôa Ribeiro F., Prazeres D.M.F, Cabral J.M.S, Aires-Barros M.R.** (1997) Effect of the immobilization support on the hydrolytic activity of a cutinase from *Fusarium solani pisi*. *Enzyme and Microbial Technology* **29**: 93 – 101.
- **Guisan J.M.** (2006). Immobilization of enzymes and cells. Vol. 22. 2° ed. Human Press. New York. pp. 15 – 30.

- **Gupta N., Rathi P., Singh R., Goswami V.K., Gupta R.** (2005) Single-step purification of lipase from *Burkholderia multivorans* using polypropylene matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **67**: 648 – 653.
- **Grogan G.** (2008) Biotransformations. The Royal Society of Chemistry. Annual Report on the Progress of Chemistry. Section B. **104**: 211 – 233.
- **Hartmeier W.** (1985) Immobilized biocatalysts – from simple to complex systems. *Trends in Biotechnology*. **3 (6)**: 149 – 153.
- **Ho Sik Rho, Heung S.B., Jae W.Y., Sujong K., Jin Y.L., Duck H.K., Seop C.** (2007) New 5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one derivative has both tyrosinase inhibitory and antioxidant properties. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. **28 (3)**: 471 – 473.
- **Illanes A.** (2008). *Enzyme Biocatalysis: Principles and Application*. Springer – Verlag New York Inc. New York. pp 1 – 39, 155 – 169.
- **IUPAC.** (1997). Biotransformations of non-natural compounds: state of the art and future development. *Pure and Applied Chemistry*. **69(8)**: 1613 – 1632.
- **Jaeger K.E, Dijkstra B.W., Reetz M.T.** (1999). Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews of Microbiology*. **53**: 315 – 351.
- **Käfer E.** (1977) Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Advances in Genetics*. **19**: 33 – 131.
- **Käfer E., Hill T.W.** (2001). Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Newsletter*. **48**: 20 - 21.
- **Karpushova A., Brümmer F., Barth S., Lange S., Schmid R.D.** (2005). Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of novel esterases from *Bacillus* sp. associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **67**: 59-69.
- **Katz M.E., Masoumi A. Burrows S.R., Shirliff C.G., Cheetham B.F.** (2000). The *Aspergillus nidulans xprF* gene encodes a hexokinase-like protein involved in the regulation of extracellular proteases. *Genetics*. **156**: 1559 – 1571.

- **Kawasaki L., Farrés A., Aguirre J.** (1995). *Aspergillus nidulans* mutants affected in acetate metabolism isolated as lipid nonutilizers. *Experimental Mycology*. **19**: 81 – 85.
- **Koeller K.M., Wong C.H.** (2001). Enzymes for chemical synthesis. *Nature*. **409**: 232 – 240.
- **Liu K.J., Shaw J.F.**, (1998) Lipase-catalyzed synthesis of kojic acid esters in organic solvents. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **75 (11)**: 1507 – 1512.
- **Loughlin W.** (2000). Biotransformations in organic synthesis. *Bioresource Technology*. **74**: 49 – 62
- **Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-LaFuente R.** (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*. **40**: 1451-1463.
- **Mayordomo I., Randez-Gil F., Prieto J.A.** (2000). Isolation, purification and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**: 105 – 109.
- **Mellou F., Lazari D., Skaltsa H., Tselepis A.D., Kolisis F.N., Stamatis H.** (2005). Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Biotechnology*. **116**: 295 – 304.
- **Mhetras N.C., Bastawde K.B., Gokhale D.V.** (2008). Purification and characterization of acid lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource Technology*. **100**: 1486 – 1490.
- **Nawani N., Singh R., Kaur J.** (2006). Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electronic Journal of Biotechnology*. **9 (5)**: 559 – 565
- **Neves M.T., Fojan P., Petersen S.B.** (2001). How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *Journal of Biotechnology*. **85**: 115 – 147.
- **Nyaradzo T.L., Chigorimbo-Murefu, Riva S., Burton S.G.** (2009). Lipase-catalysed synthesis of esters of ferulic acid with natural compounds and

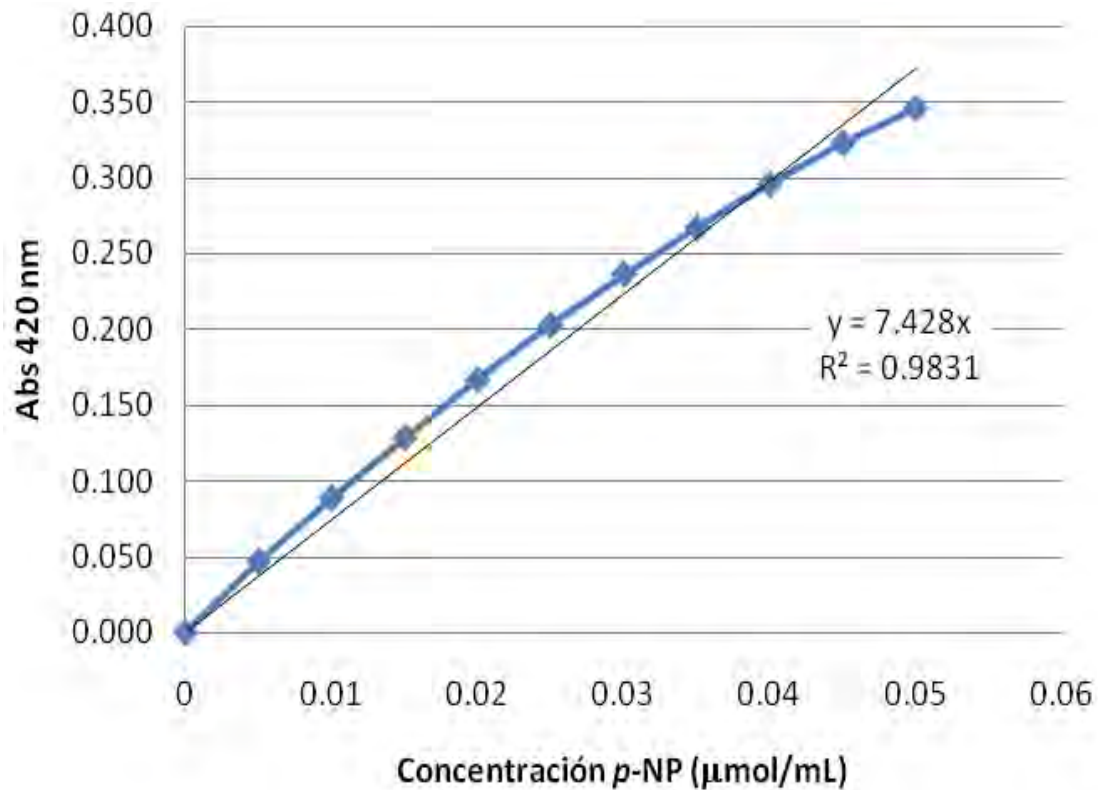
- evaluation of their antioxidant properties. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. **56**: 277 – 282.
- **Panda T., Gowrishankar B.S.** (2005) Production and applications of esterases. Applied Microbiology and Biotechnology. **67**: 160 – 169.
 - **Peña-Montes C.** (2001). Producción, purificación y caracterización bioquímica de una enzima con actividad lipolítica en *Aspergillus nidulans*. Tesis. Maestría en Ciencias. Facultad de Química. UNAM
 - **Peña-Montes C.** (2009). Análisis de la expresión y caracterización de la esterasa StcI involucrada en la biosíntesis de esterigmatocistina en *Aspergillus nidulans*. Tesis, Doctorado en Ciencias. Facultad de Química. UNAM.
 - **Peña-Montes C., Lange S., Castro-Ochoa D., Ruiz-Noria K., Cruz-García F., Schmid R., Navarro-Ocaña A., Farrés A.** (2009). Differences in biocatalytic behavior between two variants of StcI esterase from *Aspergillus nidulans* and its potential use in biocatalysis. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. **61 (3-4)**: 225 – 234.
 - **Paiva A.L., Balcao V.M., Malcata X.** (2000). Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. Enzyme and Microbial Technology. **27**: 187 – 204.
 - **Polaina J., MaxCabe A.P.** (2007). Industrial Enzymes: structure, function and applications. Springer. Netherlands. pp. 263 – 315
 - **Raku T., Tokiwa Y.** (2003). Regioselective synthesis of kojic acid esters by *Bacillus subtilis* protease. Biotechnology Letters. **25**: 969 – 974.
 - **Reetz M.T.** (2002). Lipases as practical biocatalysts. Current Opinion in Chemical Biology. **6**: 145 – 150.
 - **Sabbani S., Hedenström E., Nordin O.** (2006). The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilizing support material Accurel. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. **42**: 1 - 9
 - **Salis A., Sanjust E., Solinas V., Monduzzi M.** (2003). Characterization of Accurel M P 1004 polypropylene powder and its use as support for lipase immobilisation. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. **24-25**: 75 - 82

- **Sánchez-Otero M., Valerio G., García H, Oliart R.** (2008). Immobilization in the presence of Triton X-100: modifications in activity and thermostability of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 lipase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **35 (12)**: 1687 – 1693.
- **Schrag J.D., Cygler M.** (1997). Lipases and α/β hydrolase fold. *Methods in Enzymology*. **284**: 85 – 107.
- **Smith L.C., Faustinella F., Chan L.** (1992). Lipases: three-dimensional structure and mechanism of action. *Current Opinion in Structural Biology*. **2**: 490 – 496.
- **Synytsya A., Blafková P., Synytsya A., Copíková J.** (2008). Conjugation of kojic acid with chitosan. *Carbohydrate Polymers*. **72**: 21 – 31.
- **Villeneuve P.** (2007). Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnology Advances*. **25**: 515 – 536.
- **Volcan R., Vieira R., Peixoto B., da Silva C., Campbell S., Martins O., Ceva O.A, Guimaraes D.M.** (2008). Immobilization of a recombinant thermostable esterase (*Pf2001*) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: Isotherms, hyperactivation and purification. *Biochemical Engineering Journal*. **39**: 531 – 537.
- **Whiterhurst R.J., Law B.A.** (2002) *Enzymes in Food Technology*. Sheffield. Academic Press. pp. 1, 31 – 33, 104, 105.
- **Wiseman A.** (1985). *Manual de biotecnología de los enzimas*. Acribia. España.
- **Yang-Hoon K., Jee-Won L., Seung-Hyeon M.** (2003). Uniqueness of Microbial Cutinases in hydrolysis of *p*-nitrophenyl esters. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **13 (1)**: 57 – 63.
- **Zuñiga V.** (2004). Inmovilización de lipasa de *Bacillus pumillus* GMA1. Tesis. Química de alimentos. Facultad de Química. UNAM

Recursos electrónicos

- IUNBMB nomenclature [en l ínea] En: Enzyme nomenclature. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>> [Consulta: 1 julio 2008]

10. Apéndice

10.1 Curva patrón de *p*-nitrofenol para cuantificación de actividad de esterasa

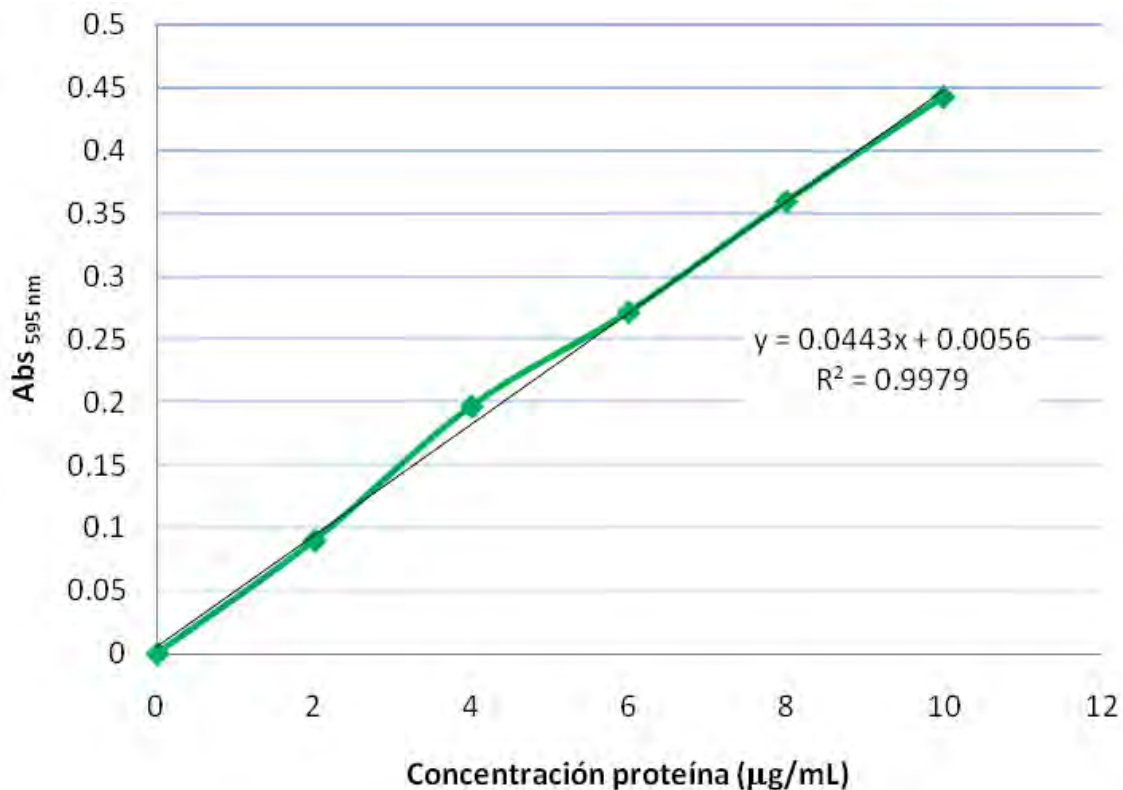
Se utilizó una solución estándar de *p*-nitrofenol (10 μmol/mL) (Sigma Aldrich)

La ecuación de la recta es:

$$\text{Abs 420nm} = 7.428 * (\text{Concentración de } p\text{-NP})$$

De la cual:

$$\text{Concentración } p\text{-NP } (\mu\text{mol /mL}) = \frac{\text{Abs 420nm}}{7.428}$$

10.2 Curva patrón de Bradford para cuantificación de proteína.

Para la construcción de la curva patrón de Bradford se utilizó como estándar BSA (2 a 10 µg/mL).

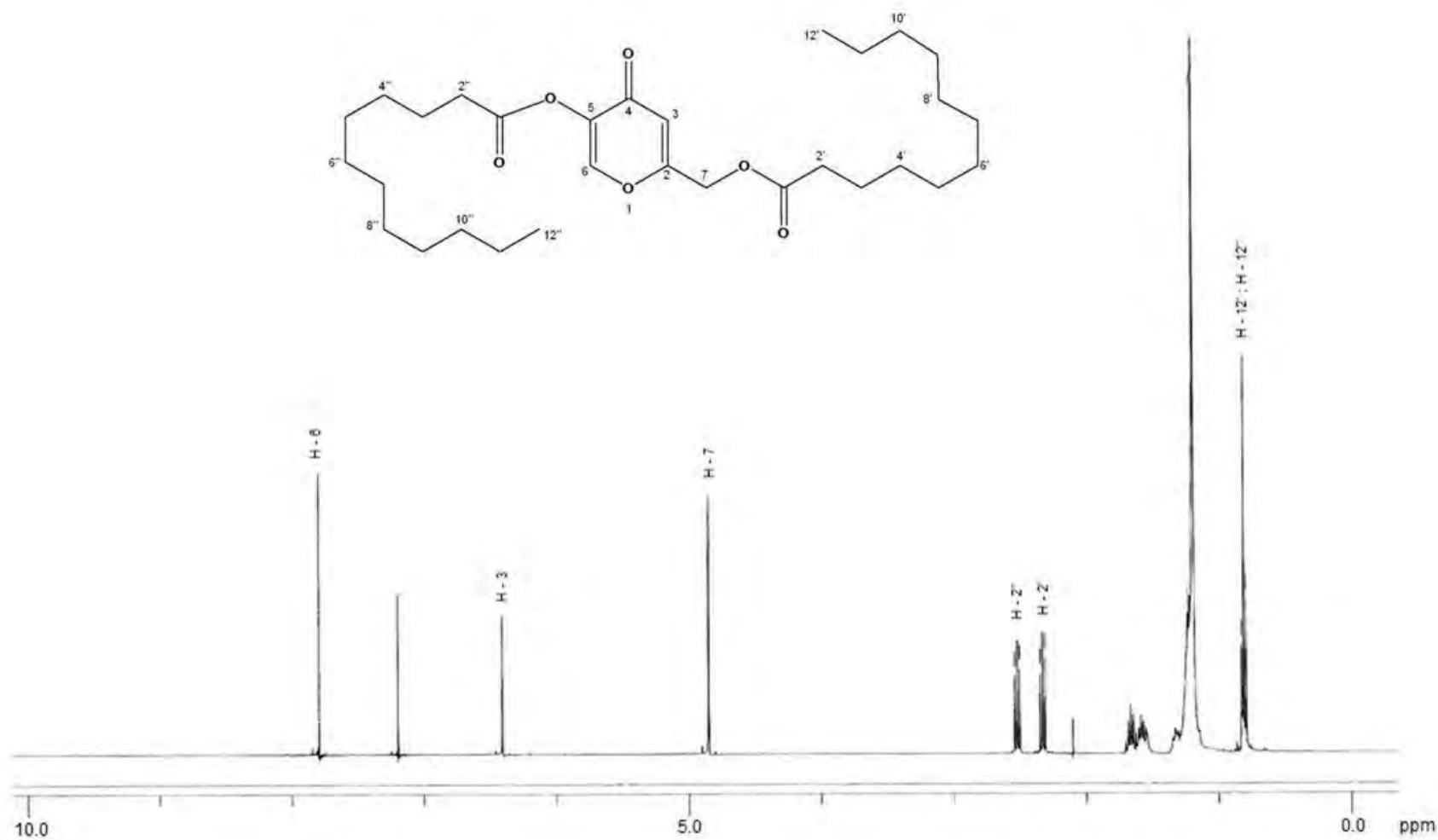
Se obtuvo la ecuación de la recta:

$$\text{Abs } 595\text{nm} = 0.0443 * (\text{Concentración de proteína}) + 0.0056$$

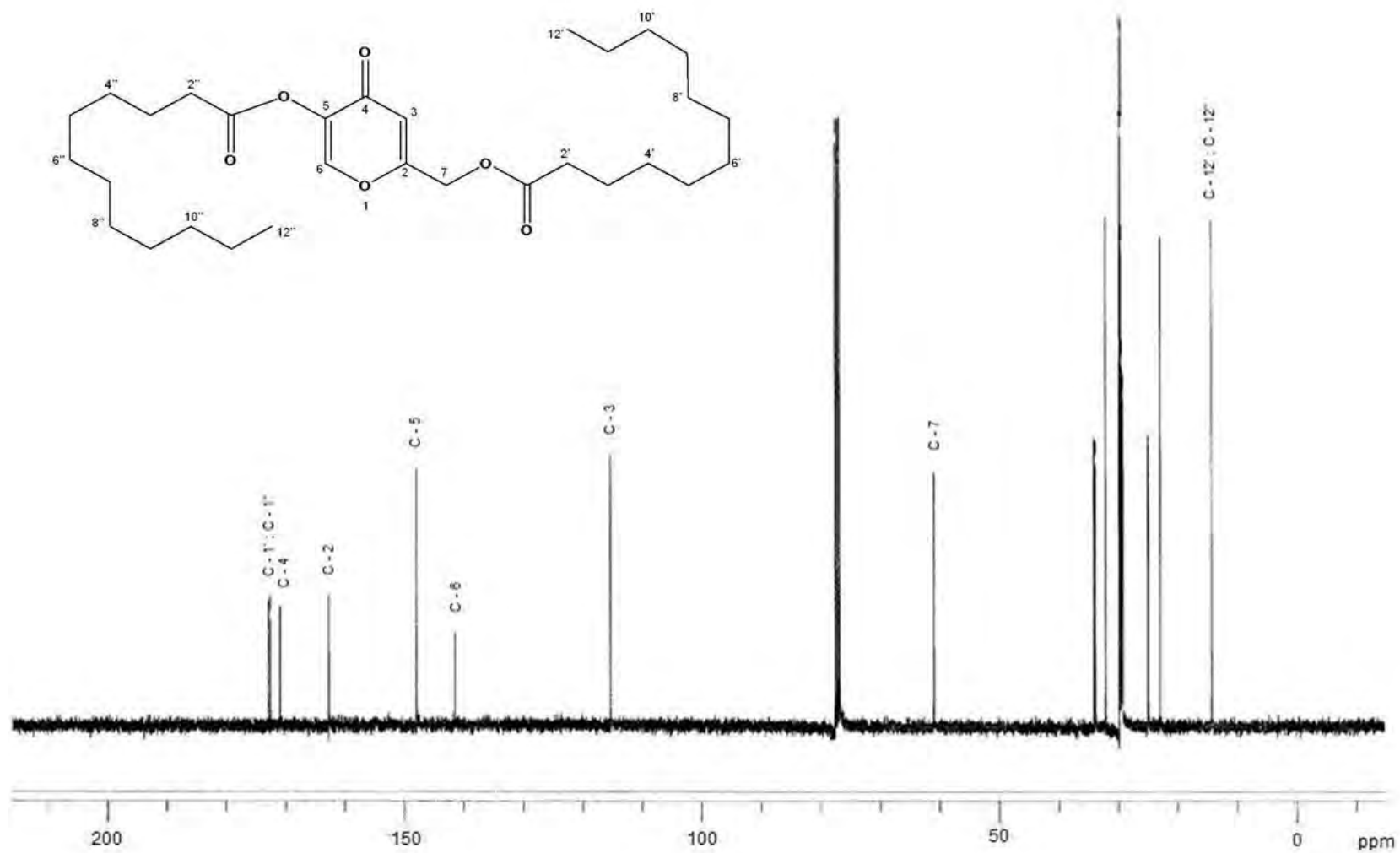
De la cual:

$$\text{Concentración de proteíán (µg/mL)} = \frac{\text{Abs } 595\text{nm} - 0.0056}{0.0443}$$

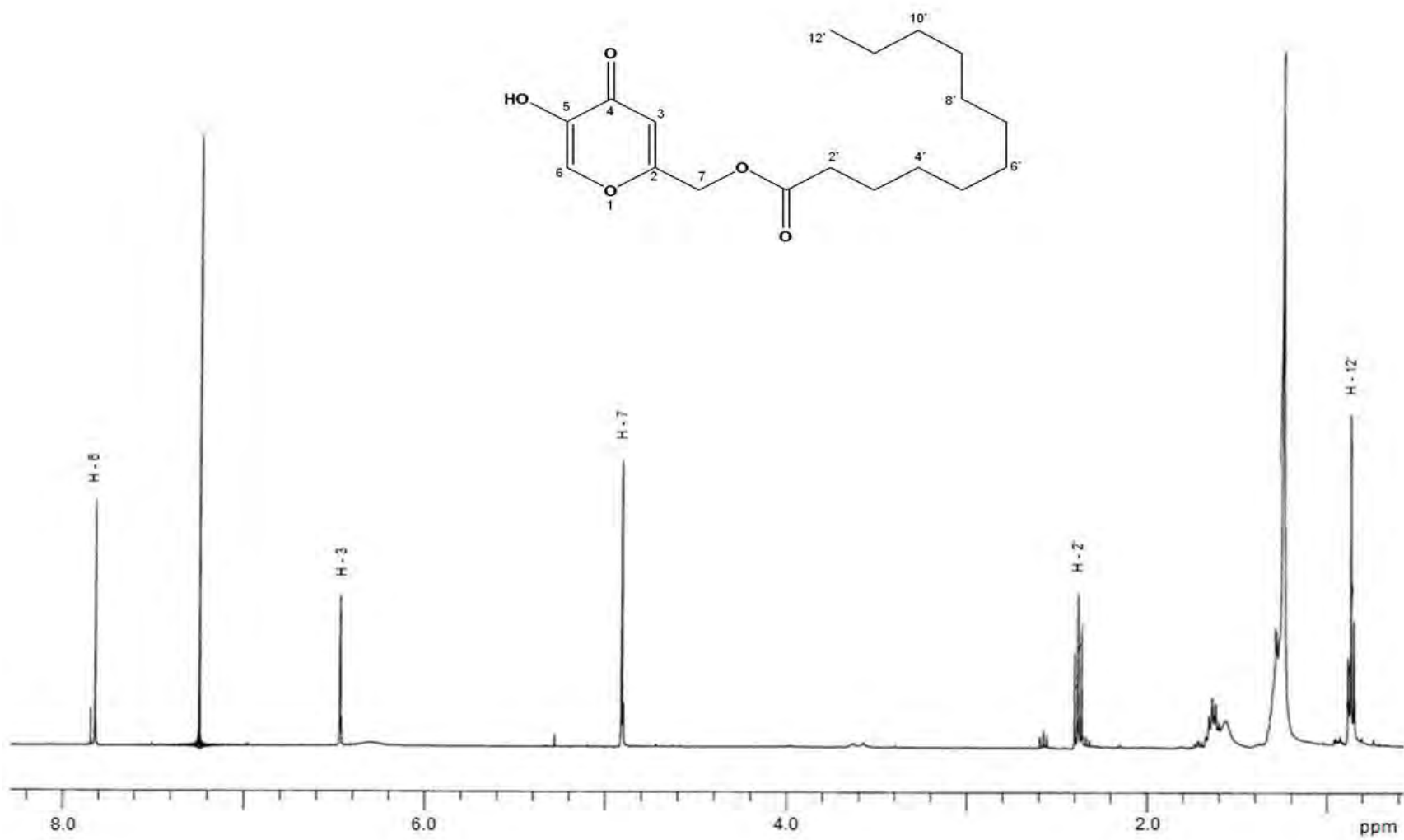
10.3 Espéctros de RMN



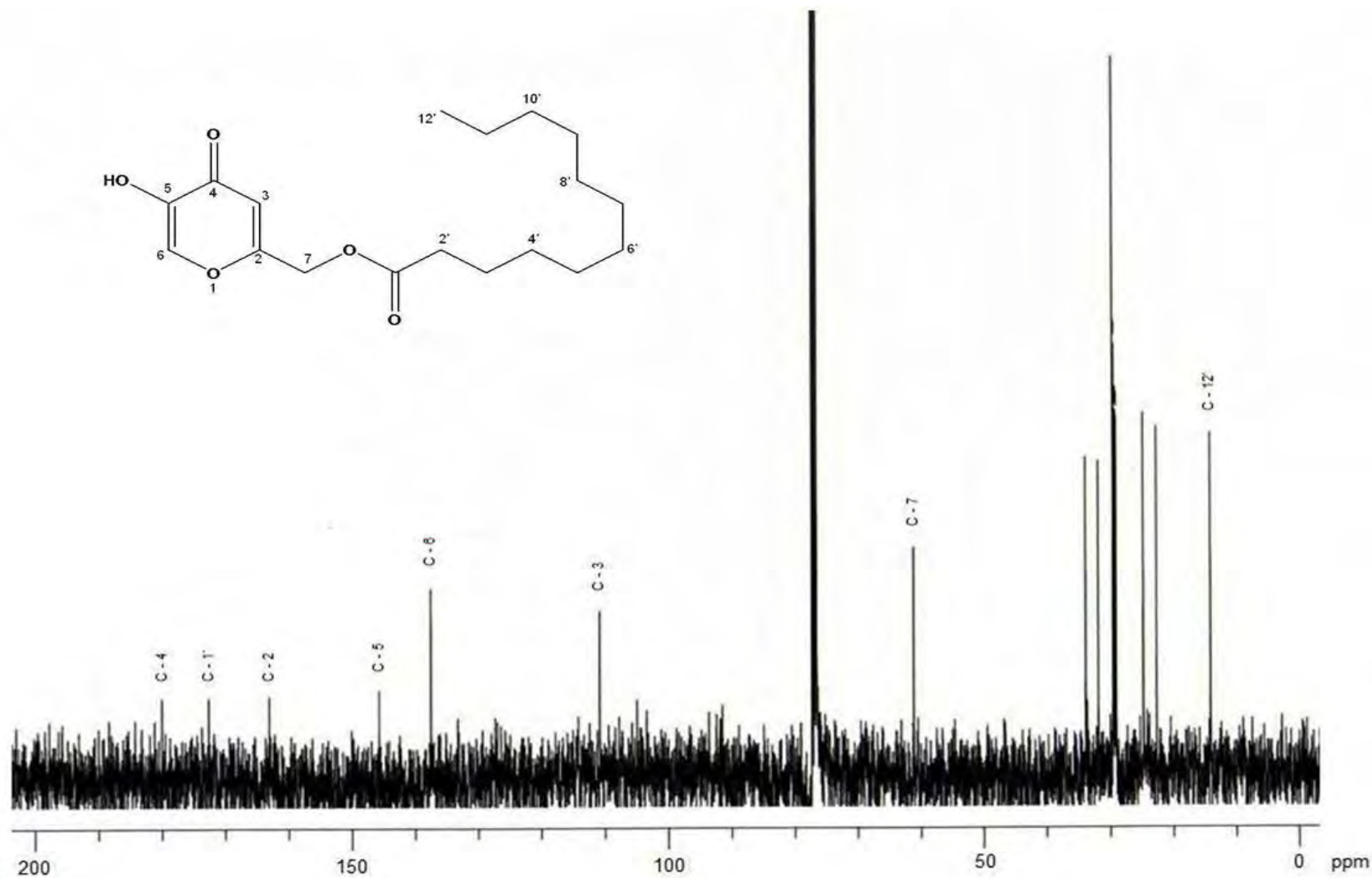
Espectro 1 RMN – ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) Dilaurato de ácido kójico



Espectro 2 RMN – ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) Dilaurato de ácido kójico



Espectro 3 RMN – ¹H (CDCl₃, 400 MHz) Monolaurato de ácido kójico



Espectro 4 RMN – ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) Monolaurato de ácido kójico