



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
Facultad de Química

BASES MOLECULARES Y BIOQUÍMICAS
PARA EL ESTUDIO DEL SISTEMA
CUTINOLÍTICO
DE *Aspergillus nidulans*

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

EVA PATRICIA BERMÚDEZ GARCÍA

Tutora: Dra. Amelia Farrés González-Saravia

Facultad de Química UNAM

MÉXICO, D. F.

FEBRERO/2013

RECONOCIMIENTOS

Jurado Asignado

Presidente: Dra. Marina Gavilanes Ruiz

Vocal: Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros

Vocal: Dr. Miquel Gimeno Seco

Vocal: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

Secretario: Dr. Manuel Jiménez Estrada

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología del Edificio E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Amelia Farrés González-Saravia y la supervisión técnica de la Dra. Carolina Peña Montes.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero de CONACyT (Beca de Maestría no. 53438) y de los proyectos PAPIIT-UNAM (IN231311) y CONACyT (153500).

ASESOR

Dra. Amelia Farrés González-Saravia

SUSTENTANTE

Eva Patricia Bermúdez García

Ever tried. Ever failed.

No matter. Try Again. Fail again.

Fail better.

S. Beckett

If you had such a dream

Would you get up and do the things you believe in?

I could be dreaming- Belle and Sebastian

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme cada día continuar mi formación dentro de sus bellas instalaciones. Por enriquecer mi espíritu con nuevos conocimientos.

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas por ser un programa de calidad, preocupado por formar alumnos bien preparados capaces de superar los retos que exige nuestro ambiente profesional.

A la Dra. Amelia Farrés por permitirme seguir formando parte de su grupo de trabajo; por su invaluable apoyo brindado en todo momento dentro y fuera del laboratorio pero sobre todo por el cariño que siempre me ha dado y por el excelente ser humano que es. Muchas gracias por todos los momentos compartidos.

A la Dra. Carolina Peña, por todos sus consejos y sus valiosas observaciones; porque a pesar de sus múltiples ocupaciones siempre estuvo ahí para escucharme y orientarme y porque más que una asesora ha sido siempre una amiga cariñosa.

Al Q.A. Israel García Cano por su cuantiosa ayuda y asesoría en el laboratorio. Porque todas sus observaciones y consejos me ayudaron a mejorar mi forma de trabajo y a no perder nunca de vista mi objetivo final. Pero además ¡por su gran amistad y por todos los momentos compartidos a lo largo de estos años!

A los miembros de mi Comité Tutorial: al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por su infinita paciencia y sus acertados comentarios que permitieron orientar adecuadamente esta investigación y al Dr. Francisco Ruiz Terán por sus consejos, observaciones y sobre todo por las buenas pláticas que hemos tenido dentro y fuera del laboratorio... ¡ah y por recordarme a cada rato lo mucho que me gusta Casablanca!

A los miembros de este Jurado por el tiempo y esfuerzo empleado en la revisión de este escrito así como por las observaciones hechas sobre el mismo.

A Fer por ser la mejor compañera de trabajo; por compartir conmigo todas las alegrías y tristezas que nos ocasionó *A. nidulans*. Porque nunca tiró la toalla, ¡ni siquiera después de doce corridas de PrepCell!

A todos los compañeros del laboratorio 312 por ser parte de un gran grupo de trabajo en el que siempre encontré apoyo y aliento cuando lo necesité; pero gracias en especial a aquellos que me demostraron que la familia no necesita compartir los mismos genes: a Isra, a Manuel, a Marianita, a Myrna, a Lalo, a Stef y a Ales por ser los mejores compañeros, amigos y hermanos (todo en uno). Gracias por compartir conmigo los triunfos y los fracasos, las alegrías, los enojos y las risas de todos los días dentro y fuera del laboratorio. ¡Los quiero mucho!

A Jose Luis, por ser, dentro y fuera del laboratorio, ¡mi mejor amigui! Por todas las veces que me has escuchado, aconsejado y ayudado; por aguantar mi mal genio y mi llanto; por unirme a mi risa y disfrutar mis triunfos como tuyos. También por todos los gustos cinéfilos que compartimos, y porque te gusta JGL casi tanto como a mí.

A Páez porque ocho años de amistad me lo permiten. Porque junto con Pepe, Myrna, Lalo y Ales hiciste que la Maestría fuera divertida, entretenida e inolvidable. Gracias por cuidarme siempre y por todos tus consejos y advertencias; aunque a veces no te haga caso sabes que te quiero mucho.

A las QA's por seguir siendo las niñas más lindas con las que he convivido. Por todo lo que hemos pasado juntas y por todo lo que vendrá. Porque seguiremos compartiendo nuestra dicha hasta que estemos viejitas y arrugadas.

DEDICATORIA

A mis padres Patricia García y Guillermo Bermúdez por ser el apoyo que me ha permitido llegar hasta aquí.

Mami gracias por todo tu amor, tu infinita entrega y tu lucha diaria por hacer de mí una mejor persona. Gracias por estar siempre a mi lado, por preocuparte por todo lo que me pasa y por tener siempre las palabras de aliento que necesito para levantarme y continuar después de un mal paso. Gracias también por tus regaños y tus críticas porque me han impulsado a corregir mis errores y a tratar cada día de mejorar mis fallos. ¡Te quiero y sé nunca podré pagar por todo lo que me has dado!

Papá gracias por no dejar de preocuparte por mí pese a la distancia que nos separa.

A mi abuelo, por ser un gran ejemplo de dedicación y trabajo. Por todo tu cariño y por preocuparte siempre por mí.

Por último a la familia García por todo el apoyo y cariño que he recibido durante todos estos años. Por alegrarse de mis logros y por estar unidos siempre y para siempre.

INDICE GENERAL

Tabla de Abreviaturas	I
Índice de Figuras	II
Índice de Tablas	III
Índice de Gráficos	III
1.Resumen	1
2.Marco teórico	2
Generalidades y estructura de cutinasas	2
Géneros productores	5
El género <i>Aspergillus</i>	6
Producción y purificación de cutinasas	7
Aplicaciones de las cutinasas	8
Alimentos: modificación de grasas y aceites	8
Alimentos: síntesis de aromas	9
Alimentos: lipofilización de antioxidantes naturales	10
Detergentes	10
Degradación de insecticidas	11
Degradación de ftalatos	11
Degradación de polímeros sintéticos	12
Producción de biodiesel	12
Cutinasas recombinantes	13
Clonación de genes de cutinasas de <i>A. nidulans</i>	13
El vector pPICZ α	15
Purificación de proteínas mediante una cola de histidinas	17
3.Justificación e Hipótesis	18
4.Objetivos	19
5.Materiales y métodos experimentales	20
Diagramas experimentales	20
Cultivo del hongo y la enzima	22

Reactivación de la Cepa de <i>Aspergillus nidulans</i> PW1	22
Preparación de los medios de cultivo	23
Técnicas Bioquímicas	23
Determinación de proteína por Bradford en microplaca	23
Determinación de actividad cualitativa con α -Naftil acetato	24
Determinación de actividad cuantitativa con p-NPA (y otros p-NPésteres)	24
Perfil electroforético de proteínas	25
Preparación de geles SDS y determinación de actividad por zimogramas	25
Tinción con plata	25
Concentración de la enzima	25
Precipitación con sulfato de amonio	26
Diálisis de la enzima	26
Ultrafiltración	26
Purificación de la enzima	26
Caracterización de la enzima pura	27
Determinación de la temperatura óptima	27
Determinación de la estabilidad térmica	28
Determinación del pH óptimo	28
Determinación de la estabilidad al pH	28
Especificidad de sustratos	28
Efecto de iones frente a la actividad enzimática	28
Efecto de posibles inhibidores en la actividad enzimática	29
Efecto de solventes en la actividad enzimática	29
Determinación de constantes cinéticas	29
Determinación de sitios de glicosilación	29
Técnicas biocatalíticas	30
Evaluación de la actividad hidrolítica de cutina	30
Técnicas moleculares	30
Identificación de los genes correspondientes a las cutinasas	30
Diseño de cebadores	30
Extracción de ARN y RT-PCR	30
Preparación de geles de agarosa	33

Síntesis de genes	33
PCR con cebadores específicos	34
Purificación de bandas de ADN a partir de geles de agarosa	34
Precipitación de ADN	34
Construcción de los plásmidos pPICZ α Bcut21 y pPICZ α Bcut28	35
Preparación de células competentes para transformación en <i>E. coli</i>	36
Transformación de <i>E. coli</i>	36
PCR de colonia	37
Extracción de plásmido	37
Expresión del vector pPICZ α Bcut21 en <i>Pichia pastoris</i>	38
6.Resultados y Discusión	41
Producción de la cutinasa de 29 kDa en el medio optimizado	41
Concentración de la proteína y cuantificación de la actividad	42
Purificación mediante cromatografía en gel de poliacrilamida	45
Determinación de actividad en las fracciones colectadas	46
Caracterización de la cutinasa de 29 kDa	47
Efecto de la temperatura sobre de la cutinasa de 29 kDa	47
Efecto del pH sobre la actividad de la cutinasa de 29 kDa	49
Estabilidad frente a la temperatura y al pH	50
Determinación de la especificidad por sustrato	53
Efecto de iones metálicos	54
Efecto de posibles inhibidores frente a la actividad enzimática	55
Efecto de solventes en la actividad enzimática	55
Cálculo de parámetros cinéticos	56
Determinación de sitios de glicosilación	58
Ensayo de actividad cutinolítica	58
Obtención de los genes de las 2 cutinasas de <i>A. nidulans</i>	59
Diseño de cebadores	60
Amplificación a partir del ARN	60
Extracción de ARN total	60
Extracción directa de ARNm y RT-PCR de un solo paso	62
Amplificación del ADN maduro de los genes de interés	63

Síntesis de genes	63
Construcción del vector de clonación	64
Doble digestión	64
Ligación con la enzima ADN ligasa T4 de Fermentas	65
Transformación en <i>E. coli</i>	66
Nuevo ensayo de ligación. Ligasa T4 de NEB	67
Selección de clones de interés mediante PCR de colonia con cebadores específicos	68
Expresión del vector pPICZ α Bcut22 en <i>Pichia pastoris</i>	69
Inducción de la cutinasa de 22 kDa en <i>P. pastoris</i> en medio líquido	71
7. Conclusiones	72
8. Perspectivas	74
9. Bibliografía	75
Anexos	81
Anexo A: Medios de cultivo utilizados	81
Anexo B: Soluciones Stock para medios de cultivo	83
Anexo C: Cosecha y conteo de esporas	84
Anexo D: Curva patrón de Bradford para determinación de proteína	85
Anexo E: Curva patrón de <i>p</i> -NP para determinación de actividad	87
Anexo F: Mini PrepCell	88
Anexo G: Prueba estadística t de Student para dos muestras independientes de idéntico tamaño	90
Anexo H: Espectros de IR para la reacción de hidrólisis de cutina	91
Anexo I: Secuencias de los genes de las 2 cutinasas de <i>A. nidulans</i>	93

TABLA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Å	Angstrom. Unidad equivalente a 10^{-10} m
a_w	Actividad acuosa
AOT	Bi (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio *
AOX	Alcohol oxidasa (enzima)
CAPS	Ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico*
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CWDE	Enzimas Degradadoras de la Pared Celular *
DHAS	Dihidroxiacetona sintasa
DMSO	Dimetil sulfóxido
E_a	Energía de activación
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético*
kb	kilo bases (1000pb)
kDa	kilo Dalton
logP	Logaritmo del coeficiente de partición
α -NA	α -Naftil acetato
p-NPA	p-Nitrofenil Acetato
p-NPB	p-Nitrofenil Butirato
p-NPC	p-Nitrofenil Caprilato
p-NPE	p-Nitrofenil Estearato
p-NPL	p-Nitrofenil Laurato
p-NPM	p-Nitrofenil Miristato
p-NPP	p-Nitrofenil Palmitato
PA	Ácido palmítico*
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida *
pb	Pares de bases
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo *
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa*
SDS	Dodecil sulfato de sodio*
sp	Especie
TAG	Triacilglicerol
TCA	Ácido tricloroacético*
TE	Tris-EDTA

*Por sus siglas en inglés

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
2.1. Diagrama del plegamiento α/β de la cutinasa de <i>F. solani</i> f. sp. <i>psij</i> ,	2
2.2. Estructura y composición de la cubierta de las plantas,	3
2.3. Reacciones catalizadas por cutinasas	4
2.4: Ejemplo de la reacción de transesterificación	14
2.5. Metabolismo del metanol en <i>P. pastoris</i> .	16
2.6. Mapa del vector pPICZ α	17
6.1. Medición de actividad cualitativa de extractos crudos	41
6.2. Perfil de proteínas de los extractos crudos y determinación cualitativa de actividad	41
6.3. Perfil de proteínas (SDS-PAGE) y zimograma para las fracciones concentradas.	44
6.4. Medición cualitativa de actividad de las fracciones colectadas de la Cut 29 (ANCUT2)	45
6.5. Gel SDS-PAGE para las fracciones con actividad de la cutinasa de 29 kDa	46
6.6. CCF de la reacción de hidrólisis de cutina revelada con diclorofluoresceína	58
6.7. Secuencia del gen AN5309	59
6.8. Secuencia del gen AN7541	60
6.7. Determinación de integridad del ARN	61
6.8. Análisis de los productos de amplificación de los genes cut 21 y cut 29	62
6.9. Gel de agarosa al 1% para observar los productos de amplificación del del RT-PCR	63
6.10. Amplificación de los genes de cutinasa a partir de genes sintéticos	64
6.11. Doble digestión de los genes cut21 y cut29 y del plásmido pPICZ α B	65
6.12. Determinación de eficiencia de ligación.	66
6.13. PCR de colonia de las clonas crecidas en medio LB-Zeocina	67
6.14. Gel de agarosa 1%. PCR de colonia para gen de la cutinasa de 21kDA.	68
6.15. Gel agarosa 1%. PCR de colonia para gen de la cutinasa de 29kDa	68
6.16. Gel de agarosa al 1.5% para comprobar la linearización del vector pPICZ α Bcut21	69
6.17. Ejemplo de las clonas de <i>P. pastoris</i> transformadas con el vector pPICZ α Bcut21 en medio YPDZ con Tributirina.	70
6.18. Gel de agarosa al 1.5% PCR con cebadores universales AOX de clonas positivas	70
6.19. Medición de la actividad cualitativa a diferentes tiempos de inducción.	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
2.1. Géneros productores de cutinasas	5
2.2. Características del vector pPICZ α	17
6.1. Comparación de la actividad específica (U/mg proteína)	44
6.2. Resumen del procedimiento de purificación de la cutinasa de 29 kDa de <i>A. nidulans</i>	46
6.3. Parámetros cinéticos de la cutinasa de 29 kDa	57
6.4. Parámetros cinéticos de diferentes lipasas y esterasas	57
6.5 Sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas	65

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfico	Página
6.1. Actividad enzimática volumétrica	42
6.2. Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford	43
6.3. Actividad específica	43
6.4. Efecto de la temperatura sobre la cutinasa de 29 kDa	47
6.5. Actividad residual de la cutinasa de 29 kDa a las diferentes temperaturas	48
6.6. Gráfica de Arrhenius para la hidrólisis de p-NPA por la cutinasa de 29 kDa	48
6.7. Efecto del pH en la actividad de la cutinasa de 29 kDa	49
6.8. Actividad residual de la cutinasa de 29 kDa frente al pH	50
6.9. Estabilidad térmica frente al tiempo de la cutinasa de 29 kDa	51
6.10. Estabilidad frente al tiempo y al pH de la cutinasa de 29 kDa	52
6.11. Especificidad frente a largo de cadena de la cutinasa de 29 kDa.	53
6.12. Efecto de diferentes iones metálicos, surfactantes y posibles inhibidores en la actividad enzimática de la cutinasa de 29 kDa.	54
6.13 Estabilidad de la cutinasa de 29 kDa frente a dos concentraciones de solventes orgánicos.	56
Gráfico 6.14. Gráfico de Michaelis-Menten y su representación de Lineweaver- Burke	57

1. RESUMEN

Las cutinasas (E.C. 3.1.1.74) son enzimas que se clasifican como carboxilesterasas, ya que llevan a cabo la hidrólisis de ésteres de ácidos carboxílicos. Su sustrato principal es la cutina, el componente lipídico estructural de la cutícula de las plantas, aunque también actúan sobre ésteres de cadena corta y de cadena larga, y tienen una similitud catalítica con otras carboxilesterasas como las lipasas y las esterasas. Debido a su amplia actividad hidrolítica, pueden tener numerosas aplicaciones en las industrias de alimentos, detergentes y la de farmacia, así como en la química ambiental, ya que pueden degradar compuestos tóxicos como los ftalenos. Recientemente se ha propuesto su uso para generar biocombustibles como el biodiesel. Las cutinasas son producidas por diversas fuentes, sin embargo las más comunes provienen de hongos fitopatógenos, siendo la más estudiada la cutinasa de *Fusarium solani*. Existe un gran interés en obtener cutinasas de otras fuentes, estudiarlas y caracterizarlas debido a sus numerosas aplicaciones. En el grupo de trabajo se ha estudiado el modelo de *Aspergillus nidulans*, en cuyo genoma hay reportadas 60 carboxilesterasas dentro de las cuales destacan 4 cutinasas putativas. Utilizando medios de cultivo optimizados se han identificado dos de estas cutinasas, con masas moleculares de 29 y 22 kDa. Estas dos enzimas tienen inductores diferentes, ya que la primera se induce con aceite de olivo y la segunda con cutina. En el presente trabajo se pretende avanzar en el proceso de caracterización de las mismas, mediante la caracterización bioquímica y cinética de la primera, reportada inicialmente por Castro-Ochoa y colaboradores (2012) y obtener los genes de ambas con el fin último de lograr la expresión de las mismas en un sistema heterólogo y tener material biológico suficiente para generar información estructural y regulatoria del sistema cutinolítico de *A. nidulans*.

2. MARCO TEÓRICO

Generalidades y estructura de cutinasas

La similitud entre las cutinasas y otras carboxilesterasas abarca varios aspectos. Comparten características estructurales con lipasas y esterases, ya que presentan el patrón de plegamiento típico de las carboxilesterasas, que consiste en una estructura tipo α/β . La parte central está formada por 5 hojas β paralelas, cubiertas por 2 o 3 hélices α a cada lado de la hoja. Dentro del sitio activo, es necesaria la presencia de un residuo de serina, por lo que su mecanismo catalítico es similar al que presentan otras hidrolasas como las serin proteasas. Además el fragmento Gly-Tyr-**Ser**-Gln-Gly que contiene al sitio activo presenta una gran homología con la secuencia consenso Gly-(Tyr or His)- Ser-X-Gly presente comúnmente en las lipasas. En el caso de la cutinasa de *F. solani* f. sp. *pisi* (figura 2.1), la tríada catalítica Ser120-Asp175-His188 es accesible al disolvente y se encuentra en un extremo elipsoide de la proteína; está rodeado por los lazos de 80 a 87 y por el lazo más hidrofóbico al 180-188 (Carvalho, 1998). A diferencia de las lipasas, las cutinasas no presentan activación interfacial, es decir, la unión al sustrato no genera un reacomodo de la cadena principal, sino sólo la reorientación de algunas cadenas laterales que hacen el papel de una pequeña tapa, por lo que la serina catalítica suele ser accesible al sustrato aún en ausencia de una interfase. También, a diferencia de las lipasas, las cutinasas presentan una cavidad oxianiónica preformada (Martínez et al, 1992). El peso molecular de estas enzimas varía entre 20 y 60 kDa (Chen et al 2010; Maeda et al., 2005).

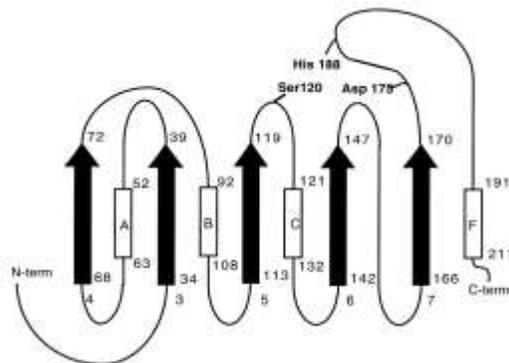


Figura 2.1. Diagrama del plegamiento α/β de la cutinasa de *F. solani* f. sp. *pisi*. Se indica la tríada del sitio activo (Ser120-Asp175-His 188), las cinco cadenas beta (flechas negras numeradas del 3-7) y cuatro hélices (marcadas A, B, C y F). Los números en el lado derecho de los elementos de la estructura secundaria señalan el inicio y final de estos elementos. Figura tomada de Egmond & de Vlieg (2000).

El sustrato principal de las cutinasas es la cutina. Un polímero estructural de las plantas, formado por ácidos grasos de cadena larga principalmente palmítico (16:0) y oleico (18:1) que se unen entre sí por enlaces tipo éster generando una red tridimensional rígida. Los ácidos grasos pueden estar hidroxilados en la parte media de la cadena o en un carbono cercano al doble enlace (Kolattukudy et al., 1980). La cutina es el componente principal de la cutícula, la cubierta exterior de la epidermis de las plantas como se observa en la **figura 2.2**. La función principal de esta capa es proteger a las plantas contra la desecación y el ataque de microorganismos (Taiz & Zeiger, 2002).

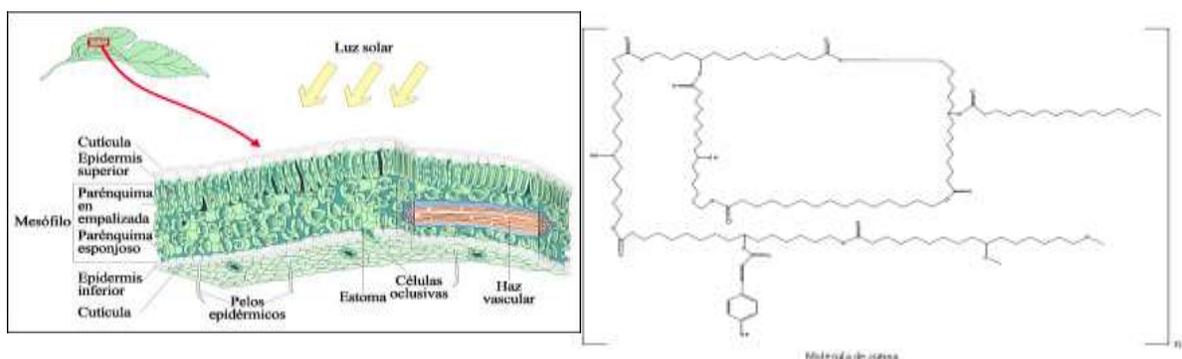
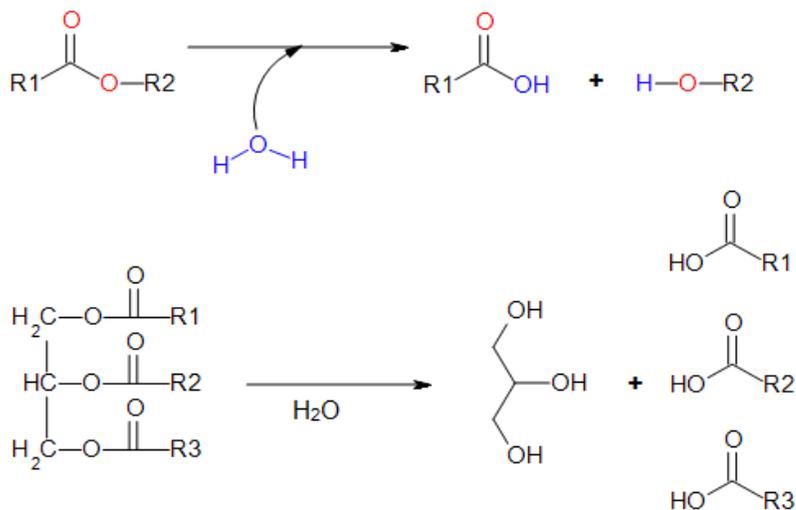


Figura 2.2. Estructura y composición de la cubierta de las plantas, 2A: Estructura de una hoja, se observa la cutícula en la parte exterior de la epidermis. 2B: Monómero de cutina.

Cabe destacar que además de la reacción natural de hidrólisis de cutina; las cutinasas pueden hidrolizar diversos ésteres y polímeros naturales o sintéticos; además estas enzimas pueden llevar a cabo reacciones de interés biocatalítico en medios orgánicos, en donde el equilibrio de la reacción se invierte hacia la síntesis de compuestos por medio de reacciones de esterificación, interesterificación y transesterificación, siempre y cuando la actividad del agua, a_w , se mantenga baja ya que así se evita que el agua libre pueda competir por realizar hidrólisis (Lountos et al., 2004). En la figura **2.3** se esquematiza un ejemplo de cada una de las cuatro reacciones que las carboxilesterasas son capaces de realizar; tanto en medio acuoso como en medios orgánicos con baja a_w .

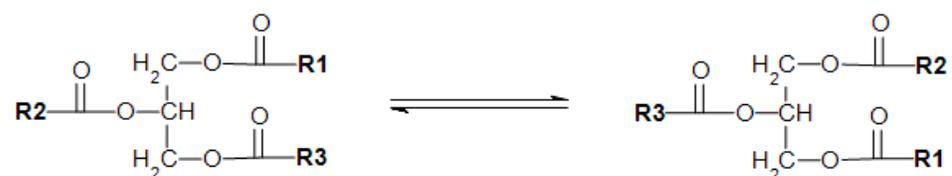
- **Hidrólisis**



- **Esterificación**



- **Interesterificación**



- **Transesterificación**

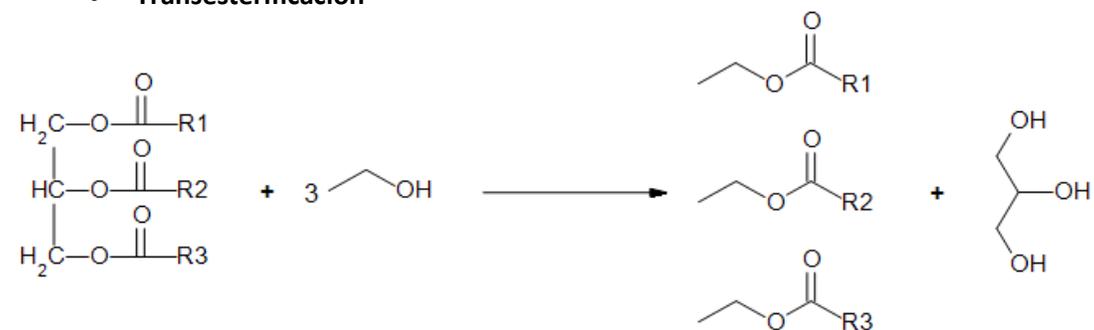


Figura 2.3. Reacciones catalizadas por cutinasas (Carvalho, 1998).

Géneros productores

Al ser enzimas generalmente inducibles por cutina o por hidrolizados de estas son producidas por numerosos géneros microbianos que invaden o infectan tejidos vegetales. Algunos de los géneros productores que se han estudiado se observan en la **tabla 2.1** Las cutinasas junto con otras hidrolasas como celulasas, pectinasas y poligalacturonasas se conocen en conjunto como CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes) y forman parte de los mecanismos de invasión de organismos fitopatógenos (Kapat et al., 1998; Kikot et al., 2009). La producción de cutinasas en hongos fitopatógenos se observó primero en medios que únicamente contenían cutina como fuente de carbono (Trail & Koller, 1990). Además se reportó que estas enzimas son sensibles a la regulación catabólica, ya que se inhiben en presencia de fuentes de carbono preferentes como la glucosa y el glicerol; por otro lado alcoholes primarios *n*-alifáticos de 14 o más átomos de carbono son buenos inductores de la enzima (Li & Kolattukudy, 1980).

Tabla 2.1: Géneros productores de cutinasas

Fuente	Género	Especie	Referencia
Hongos	<i>AlteARNria</i> <i>Aspergillus</i> <i>Botrytis</i> <i>Colleotrichum</i> <i>Fusarium</i> <i>Trichoderma</i>	<i>alteARNta</i> <i>oryzae</i> <i>cinerea</i> <i>gloesporioides</i> <i>solani</i> <i>harzianum</i>	Tanabe et al., 1988 Maeda et al., 2005 van Kan et al 1997 Dickman, 2009 Martínez et al 1992 Rubio et al., 2008
Bacterias	<i>Streptomyces</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Thermonospora</i>	<i>scabies</i> <i>putida</i> <i>fusca</i>	McQueen & Schottel, 1987 Sebastian & Kolattukudy, 1987 Fett et al., 1999
Levaduras	<i>Cryptococcus</i>	sp.	Masaki et al 2005

Entre los numerosos géneros productores, los hongos fitopatógenos tienen una gran importancia, ya que las primeras cutinasas que se estudiaron provienen de uno de ellos, *Fusarium solani*, un ascomiceto que se caracteriza por tener estructuras reproductivas de mediante conidióforos alargados. Se ha reportado que produce tres cutinasas, una de ellas inducible por cutina y otras dos que presentan una expresión constitutiva y que no

responden a la inhibición por glucosa característica de este tipo de enzimas (Li et al., 2002). La cutinasa mejor caracterizada es la Cut1 (inducible) que es una proteína de 197 residuos, 22 kDa que se esquematiza como una esfera de 21.6 \AA^3 de radio cuando se cristalizó con una resolución de 1.0 \AA (Carvalho et al., 1998; Longhi et al., 1996).

Aunque se ha visto un aumento en la virulencia del hongo cuando estas enzimas son sobreexpresadas (Lee et al., 2010); no se puede decir que sean un factor indispensable para la colonización del tejido vegetal puesto que se ha demostrado que si se eliminan los genes que codifican para las cutinasas de *Botrytis cinerea*, la patogenicidad sobre plantas de tomate y gerbera no se ve interrumpida (van Kan et al., 1997).

El género *Aspergillus*

Otro género productor de importancia es el ascomiceto *Aspergillus*, el cual agrupa a una variedad de especies fitopatógenas de habitat terrestre con una amplia capacidad metabólica y que producen numerosas enzimas extracelulares. Algunas de las especies de importancia industrial son: *A. awamori*, *A. flavus*, *A. sydowii*, *A. niger*, *A. nidulans*, y *A. oryzae*, entre otros. *Aspergillus nidulans* crece rápidamente como hongo filamentoso en sólidos o en medio líquido bajo una variedad de condiciones nutricionales, es homotálico y, normalmente, haploide, pero también puede ser inducido a crecer como diploide vegetativo. Se reproduce por medio de esporas asexuales (conidias) o por esporas sexuales (ascosporas). Es utilizado como modelo biotecnológico debido a que desde el 2008 se cuenta con su genoma totalmente secuenciado. Este contiene 30.07Mb, divididas en 8 cromosomas y con un total de 10,560 genes codificantes (Galagan et al., 2005). Dentro de su genoma, se han reportado 4 genes que codifican para posibles cutinasas, estos son:

- AN07541 (257aa) en el cromosoma IV
- AN05309 (213aa) en el cromosoma V
- AN07180 (221aa) en el cromosoma IV
- AN10346 (223aa) en el cromosoma VI

De estas cuatro, solamente una de ellas, la AN7541, que presenta un peso molecular de 29 kDa, ha sido clonada y expresada en una levadura; sin embargo, no se ha realizado ninguna caracterización sobre la enzima recombinante (van Kuyk et al., 2000). Con el

extracto crudo de la enzima nativa se han realizado pruebas de estabilidad a solventes y ensayos de hidrólisis de cutina (Castro-Ochoa et al., 2012).

Producción y purificación de cutinasas

Las cutinasas microbianas son producidas en su mayoría en medios de cultivo sumergidos, sin embargo, también se ha empleado el método de fermentación en estado sólido (Speranza et al., 2011). El efecto de la fuente de carbono y de nitrógeno sobre la expresión de este tipo de enzimas ha sido poco estudiado pero se sabe que la expresión de estas enzimas está influida por el tipo y la concentración de fuente de carbono o nitrógeno, el pH del medio, la temperatura así como la concentración de oxígeno disuelto. (Carvalho et al., 1998).

Además de la producción de cutinasas silvestres, se han hecho esfuerzos por clonaras y expresarlas en sistemas heterólogos para obtener mayores rendimientos. La primera cepa que se utilizó fue *E. coli* WK6 (Lauwereys et al., 1991) y posteriormente se desarrolló un sistema de producción más eficaz en *Saccharomyces cerevisiae*. También se han reportado estudios que emplean cepas de *Aspergillus*, como *A. awamori* (van Gemeren et al., 1996) y *A. japonicus* (Berka et al., 1995).

La purificación de cutinasas de fuentes microbianas se inicia con la separación de la biomasa del medio de cultivo por filtración cuando la enzima es extracelular; o con el uso de choques osmóticos si se encuentra dentro del anfitrión. A continuación se realiza una concentración selectiva ya sea por precipitación con sulfato de amonio, o con solventes orgánicos como acetona fría, o por medios físicos como la ultrafiltración. Luego el extracto enzimático concentrado se pasa por columnas de cromatografía, normalmente de afinidad, intercambio iónico (SP-Sephadex, DEAE-celulosa) y/o filtración en gel para recuperar la fracción de interés (Longhi et al., 1996).

Otro método de purificación empleado consiste en la extracción líquido-líquido; éste utiliza micelas reversas y es un método sencillo que se ha utilizado para aislar y purificar lipasas. Las proteínas se microencapsulan en el pool de agua de los agregados del surfactante y luego estas proteínas solubilizadas se vuelven a extraer en una fase acuosa. Este proceso de extracción se estableció por Carneiro-da-Cunha y colaboradores utilizando el surfactante aniónico AOT en isoctano (Carneiro-da-Cunha et al., 1996).

Aplicaciones de las cutinasas

En años recientes, la actividad esterolítica de las cutinasas ha sido ampliamente explorada. Carvalho y colaboradores discuten a detalle las reacciones de biocatálisis que pueden llevar a cabo las cutinasas. *In vitro* las cutinasas despliegan actividad hidrolítica hacia una amplia variedad de ésteres, desde ésteres sintéticos solubles (p-nitrofenil ésteres) a triglicéridos de cadena larga insolubles (Carvalho et al., 1998). Además, en medios no acuosos o de baja actividad de agua, pueden catalizar reacciones de síntesis como esterificación y transesterificación de diferentes sustratos (Bordusa, 2002).

Estas reacciones de hidrólisis y síntesis tienen un uso potencial en diferentes industrias : en la de lácteos para la hidrólisis de grasa de leche; en la industria de detergentes para eliminar suciedad; en la oleoquímica para la modificación de aceites también en la síntesis de triglicéridos estructurales, polímeros o surfactantes, así como productos para el cuidado personal. Otras aplicaciones son la degradación de insecticidas, sustancias tóxicas y polímeros sintéticos, así como la producción de biodiesel, entre otras (Bornscheuer, 2002). A continuación se detallan algunas de estas aplicaciones más importantes.

En la industria de los alimentos

Modificación de grasas y aceites

Las grasas y aceites son constituyentes importantes de los alimentos. El valor nutricional, sensorial y las propiedades físicas de un triglicérido son influenciados enormemente por factores tales como la posición estereoespecífica del ácido graso en el glicerol, el largo de cadena del ácido graso, y su grado de insaturación. La estructura básica de grasas y aceites puede ser modificada de diferentes maneras: modificación química del ácido graso (hidrogenación), ruptura del enlace éster (hidrólisis), y reorganización de ácidos grasos en la cadena principal del triglicérido (interesterificación). De esta manera, un lípido poco deseable y de bajo costo puede ser modificado en un producto con aplicaciones importantes con un alto valor. La transesterificación de grasas y aceites, así como la esterificación selectiva de alcoholes, se pueden obtener empleando cutinasas en bajas actividades de agua.

La hidrólisis parcial de las grasas en la leche es una transformación típica mediada por enzimas endógenas de productos lácteos. Este proceso se puede realizar por enzimas de la microbiota nativa en el producto o por la adición intencional de enzimas exógenas.

Dependiendo del grado y especificidad de la hidrólisis, la grasa de leche modificada enzimáticamente exhibirá distintas notas de sabor, a mantequilla, queso, crema, etc. La grasa de leche hidrolizada por enzimas lipolíticas o grasas de leche lipolizada (LMF) ha llegado a ser un importante ingrediente en la industria alimentaria (Badenes et al., 2010). Algunos de sus usos actuales y potenciales son adición a los productos de panadería, cereales, dulces, productos lácteos, palomitas de maíz con sabor, aderezos de ensaladas, botanas, etc. Regado y colaboradores realizaron un análisis de la hidrólisis parcial de grasas de leche de vaca, ovejas y cabras empleando lipasas microbianas y la cutinasa de *F. solani* f. sp. *pisi*. Los ácidos grasos liberados fueron analizados por HPLC. El grado de hidrólisis y el perfil de los ácidos grasos de los productos finales fueron similares a los reportados en varios productos LMF (Regado et al., 2000).

Síntesis de aromas

Los ésteres de ácidos grasos son componentes importantes de aromas naturales usados en la industria de los alimentos. Por ejemplo, el butirato de etilo y el acetato de isoamilo son compuestos encontrados en el aroma de fresas y plátanos, respectivamente (MacCabe et al., 2002). Estos ésteres son obtenidos tradicionalmente por extracción de fuentes naturales, fermentación o síntesis química (Dutta et al., 2009). Sin embargo, estos métodos suelen ser costosos o de bajo rendimiento. Con el creciente interés por los productos “naturales”, la industria del sabor está cada vez más interesada en el empleo de la biotecnología para la producción de estos compuestos, particularmente por métodos enzimáticos. La síntesis de ésteres mediante reacciones de síntesis directa en solventes orgánicos o transesterificación catalizadas por enzimas lipolíticas ha sido ampliamente reportada (Sharma et al., 2001). La cutinasa recombinante de *F. solani* f. sp. *pisi* fue empleada para catalizar la reacción de transesterificación de acetato de butilo con hexanol para la obtención de hexil acetato, un éster de cadena corta con aroma frutal. Algunos parámetros relevantes para la actividad de la enzima como el contenido de agua, temperatura, molaridad del buffer, pH, surfactantes y concentraciones de hexanol y butil acetato fueron analizados mediante diseño factorial para establecer las condiciones óptimas de reacción y se encontró que la enzima trabaja mejor a pH básico y que la relación entre agua y surfactante es determinante para la actividad de la enzima (Carvalho et al., 1998). El empleo de cutinasas en reacciones de transesterificación de etanol y ácidos grasos de cadena corta (C2-C6) en medio orgánico también ha sido estudiado, obteniéndose buenos rendimientos de los ésteres sintetizados (Jeong & Park, 2008).

Lipofilización de antioxidantes naturales

Los antioxidantes en alimentos retardan la rancidez causada por oxidación atmosférica protegiendo así los lípidos y los compuestos liposolubles como vitaminas o carotenoides.

Muchos compuestos han sido usados como antioxidantes en alimentos, incluyendo principalmente sustancias fenólicas artificiales como el butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT) los cuales han reportado tener efectos secundarios como alergias y disfunciones endócrinas. Por ello ha surgido un gran interés por el uso de antioxidantes naturales. Los ácidos fenólicos son antioxidantes naturales hidrofílicos que están presentes en frutas, vegetales, hierbas aromáticas y especias. Son de interés particular debido a sus propiedades potenciales como antioxidantes, quelantes, antiinflamatorios, antialérgicos, antivirales y anticarcinógenos. Los ácidos fenólicos (ferúlico, cafeico, cumárico, etc.) generalmente son solubles en agua, por lo que su carácter hidrofílico reduce su efectividad en la estabilización de grasas y aceites (MacCabe et al., 2002). Por lo tanto, la lipofilización o modificación de estos compuestos vía esterificación con moléculas alifáticas (ácidos grasos o alcoholes) se puede emplear como una herramienta para modificar su solubilidad en interfases agua-aceite, aire-aceite manteniendo sus propiedades funcionales originales. La esterificación química y enzimática de compuestos fenólicos ha sido reportada por diversos autores. Stamatis y colaboradores estudiaron la esterificación enzimática de antioxidantes fenólicos naturales como los derivados de ácido benzoico y cinámico con alcoholes alifáticos, monosacáridos y alquilglucósidos empleando varias lipasas, esterases y cutinasas en medios no acuosos (Stamatis, et al 1999).

Detergentes

La fabricación de detergentes biológicos es una tecnología en rápido crecimiento. Las lipasas, proteasas, amilasas y celulasas son enzimas que se añaden a las formulaciones de detergentes para la remoción de grasas, proteínas, carbohidratos, etc. El uso de cutinasas en formulaciones de detergentes para lavandería y lavaplatos ha sido evaluado. La cutinasa presentó algunas ventajas en comparación con la lipasa comercial (Lipolase™) en la remoción de triacilgliceroles en un solo proceso de lavado, así como en la hidrólisis de grasas en ausencia de calcio (Carvalho et al., 1998)

Degradación de insecticidas, ftalatos y polímeros sintéticos

Insecticidas

El malatión es un insecticida y acaricida organofosforado sintético utilizado para el control de insectos en campos de cultivo, frutas, vegetales y ganado, y también ampliamente usado como sustituto del DDT (Masaki et al., 2005). Éste, o sus residuos expuestos en el ambiente son absorbidos rápidamente por prácticamente todas las rutas incluyendo el aparato gastrointestinal, la piel, las membranas mucosas, y los pulmones. A partir de pruebas en animales y por la práctica en su uso se ha demostrado que afecta tanto el sistema nervioso central como el sistema inmune de invertebrados y cierta fauna vertebrada; las glándulas suprarrenales, hígado y sangre de pescados. El malatión también puede ocasionar mutaciones perceptibles en diversos tipos de células humanas cultivadas, incluyendo glóbulos blancos y células linfáticas. El empleo de cutinasas y esterases en la degradación de malatión ha sido evaluado. Sarka y colaboradores reportaron que la cutinasa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* degradó 50 y 60% de la cantidad inicial de malatión en 15 y 30 minutos de reacción respectivamente (Sarka et al., 1998).

Ftalatos

Los ftalatos son compuestos químicos usados principalmente en la fabricación de cloruro de polivinilo, de pinturas, lacas y cosméticos. El ftalato de dihexilo (DHP), uno de los ftalatos más usados, también se utiliza en la elaboración de juguetes, guantes del vinilo, collares, zapatos y bandas transportadoras usadas en operaciones del envasado de alimentos (Maeda et al., 2002). Los ftalatos han sido encontrados en sedimentos, agua y aire y también han sido detectados en alimentos, ya que ellos pueden migrar del material de empaque (Masaki et al., 2005). El di-(2-etilhexilo)- (DEHP), ftalato de butil *n*-benzilo (BBP) y DHP son ésteres ftálicos que están presentes principalmente en los materiales de empaquetado (papeles, cartulinas) para alimentos acuosos grasos y secos. Durante los últimos años, los ftalatos de ocurrencia más común incluyendo el DHP, fueron clasificados como contaminantes y compuestos interruptores endocrinos (EDCs) conocidos por su efecto potencial sobre la salud humana al interferir con las hormonas endógenas del cuerpo (Masaki et al., 2005).

Considerando la importancia de la búsqueda de biocatalizadores que sean efectivos en la degradación de ftalatos presentes en el ambiente y la estimación de la toxicidad de sus productos de degradación, se ha reportado que la cutinasa de *Fusarium oxysporum* f. sp.

pisi es eficiente en la degradación de los ftalatos DEHP, DHP, BBP, ftalato de di-pentilo (DPeP) y el ftalato de di-propilo (DPrP) (Maeda *et al* , 2002).

Polímeros sintéticos

Los polímeros son de gran importancia y su producción ha aumentado en los últimos años. Sin embargo, el excesivo consumo de plásticos sintéticos derivados del petróleo ha tenido un impacto adverso en el medio ambiente debido a que la mayoría de estos plásticos sintéticos no se degrada en el ambiente (Masaki *et al.*, 2005). Por esta razón, el desarrollo de polímeros o compuestos biodegradables, se presenta como una solución a la conservación del medio ambiente y al impulso de nuevas aplicaciones. A la fecha, se han desarrollado algunos tipos de poliésteres biodegradables como el poli-(ácido láctico) (PLA), poli (butileno succinato) (PBS), poli-(butileno succinato-co-adipato) (PBSA) y poli-(caprolactona) (PCL), sin embargo, su costo de producción sigue siendo elevado comparado con los plásticos sintéticos no degradables. La comprensión de los mecanismos por los cuales los polímeros sintéticos naturales o sintéticos son degradados por las enzimas microbianas sería útil en el diseño de nuevos plásticos degradables. Las cutinasas son enzimas capaces de hidrolizar una amplia variedad de ésteres sintéticos; la degradación de plásticos biodegradables ha sido reportada para las cutinasas de los microorganismos *F. solani* f. sp. *pisi*, *Pseudozyma jejuensis* sp., *Aspergillus oryzae* y *Cryptococcus* sp. (Dutta *et al.*, 2009).

Producción de biodiesel

El biodiesel se ha convertido en un combustible alternativo en lo referente a los recursos energéticos tradicionales basados en combustibles fósiles, debido a la disminución de las reservas y aumento en el precio del petróleo, así como su contribución a la conservación del medio ambiente (Jeong, 2008). El biodiesel es un combustible renovable, biodegradable y no tóxico que se obtiene principalmente a partir de aceites vegetales o grasa animal mediante el proceso de transesterificación. Químicamente se describe como una mezcla de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena corta o larga (Panda, 2005). Se obtiene por transformación de triacilgliceroles (TAG) en alquil ésteres de ácido graso en presencia de un alcohol. A la fecha se han desarrollado varios procesos para la producción de biodiesel empleando ácidos, álcalis o enzimas como catalizadores de la reacción de transesterificación.

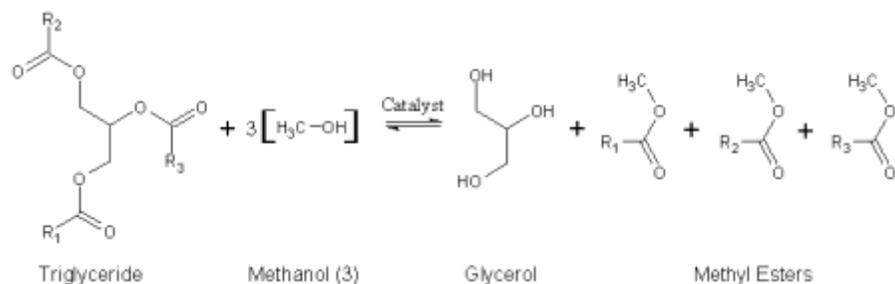


Figura2.4: Ejemplo de la reacción de transesterificación entre un TAG y un alcohol para la formación de metil ésteres

Si bien es cierto que a nivel industrial se emplea la catálisis alcalina para la producción de biodiesel, la catálisis enzimática ha ganado mucha atención. Se han reportado diversos estudios empleando enzimas lipolíticas, principalmente lipasas en reacciones de transesterificación para la producción de biodiesel (Panda & Gowrishankar, 2005). Este tipo de reacción también ha sido evaluado usando esterases y cutinasas empleando varios sistemas. Por ejemplo, la cutinasa de *F. solani* f. sp. *pisi*, fue usada para catalizar la entre una mezcla de triacilglicéridos y metanol en micelas reversas de bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT) en isooctanato con el propósito de producir biodiesel (Badenes et al., 2010). Los estudios se realizaron por lotes en pequeña escala, se estudió la influencia de la concentración inicial de enzima y alcohol, y la relación molar de sustrato. Se obtuvieron conversiones de 75 % en tiempos de reacción de 24 horas, lo cual hace el proceso enzimático altamente competitivo cuando se compara con reacciones similares catalizadas por lipasas para la producción de biodiesel empleando metanol.

Cutinasas recombinantes

Clonación de genes de cutinasas de *A. nidulans*

Debido a que el patrón de proteínas secretadas por *A. nidulans* es complejo, y varía dependiendo de la composición del medio, puede resultar difícil purificar las cutinasas nativas, puesto que no se encuentran en una cantidad mayoritaria en el medio de cultivo. Además, la obtención de la cutina que actúa como inductor para su producción es un proceso de alto costo y requiere una considerable inversión de tiempo. En casos como éste, se han utilizado sistemas de expresión heterólogos para purificar y caracterizar proteínas que no se producen en grandes cantidades en los sistemas nativos. Los vectores de clonación en algunos sistemas fungales presentan numerosas ventajas, ya que pueden autorreplicarse utilizando la maquinaria enzimática celular del hospedero y también pueden integrarse directamente en el genoma mediante mecanismos de

recombinación. Por otro lado, presentan secuencias reconocidas por diversas enzimas de restricción, que permiten la exploración de diversas estrategias de clonación.

La expresión de proteínas recombinantes depende fundamentalmente de la adecuada selección del organismo hospedero, ya que dependiendo del origen de la proteína se deberá escoger entre un sistema procarionte o eucarionte para asegurarnos de que la proteína se pliegue adecuadamente y en caso necesario se puedan llevar a cabo las modificaciones postraduccionales necesarias para que tenga actividad.

Entre los sistemas eucariontes más utilizados está *Pichia pastoris*. Al ser una levadura, es un organismo unicelular y, como las bacterias, es de rápido crecimiento y su cultivo es relativamente barato. Sin embargo, a diferencia de las bacterias, las levaduras son eucariotas que poseen el mismo ambiente intracelular y muchas de las capacidades de procesamiento pos-traduccionales de proteínas que los eucariontes superiores. Por tanto, las proteínas eucarióticas pueden ser mejor procesadas, plegadas y ensambladas para dar moléculas funcionales cuando se sintetizan en una levadura. La base conceptual de la utilización de *P. pastoris* como sistema de expresión radica en que algunas de las enzimas requeridas para el metabolismo del metanol solo están presentes en niveles observables cuando las células crecen en metanol, es decir, son inducibles. Dos de las enzimas de la vía, la AOX y la DHAS están presentes en altos niveles en células que crecen en metanol, pero no en células que crecen con otras fuentes de carbono como glucosa, glicerol o etanol (Cereghino & Cregg, 2000). El promotor que regula la producción de la alcohol oxidasa es utilizado para llevar a cabo la expresión de proteínas heterólogas en *Pichia*.

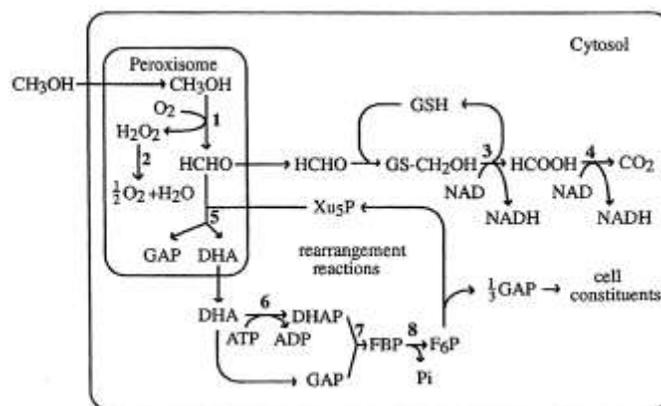


Figura.2.5. Metabolismo del metanol en *P. pastoris*. Enzimas que intervienen: 1, alcohol oxidasa; 2, catalasa; 3, formaldehído deshidrogenasa; 4, ácido fórmico deshidrogenasa; 5, dihidroxiacetona sintasa; 6, dihidroxiacetona cinasa; 7, fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa; 8, fructosa 1,6-bisfosfatasa.

La expresión heteróloga en *Pichia pastoris* puede ser intracelular o se puede lograr la secreción al medio de cultivo. Esto último requiere la presencia de una secuencia señal en la proteína expresada que la marque para ser excretada. La secuencia señal más utilizada para la secreción en *P. pastoris* es el factor de acoplamiento α pre pro de *Saccharomyces cerevisiae*. La mayor ventaja de expresar proteínas heterólogas como proteínas secretadas es que *P. pastoris* secreta niveles muy bajos de proteínas nativas en el medio mínimo. Por lo que las proteínas heterólogas serán las mayoritarias en el medio extracelular (Barr et al., 1992).

El vector pPICZ α

Este vector es utilizado para expresar proteínas que van a ser secretadas por *P. pastoris*, ya que cuenta con el α -factor de señalización de *S. cerevisiae*. La construcción del vector se ilustra en la figura 2.4 y en la tabla 2.2 se explican las características que permiten el uso de este vector para expresar proteínas heterólogas en *P. pastoris*.

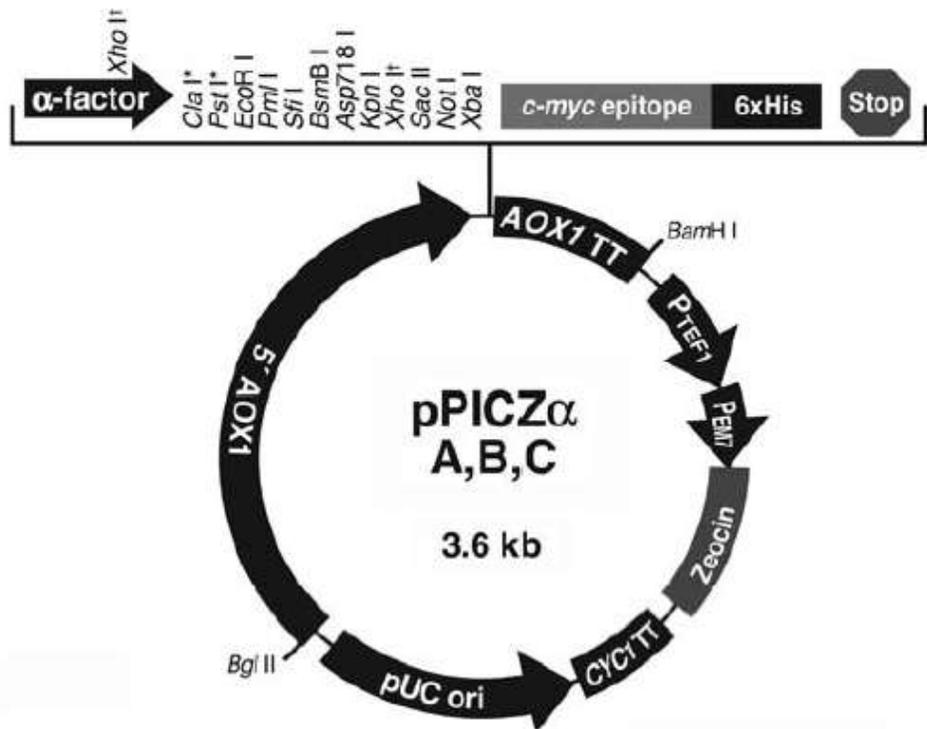


Figura 2.6: Mapa del vector pPICZ α .

Tabla 2.2: Características del vector pPICZ α

Característica	Beneficio
5' AOX1	Un fragmento de 942pb que contiene al promotor de la AOX1 permite altos niveles de expresión inducible con metanol.
Señal de secreción α -factor nativo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Permite la secreción eficiente de la mayoría de las proteínas
Sitio múltiple de clonación con sitios de reconocimiento para 10 enzimas	Permite la inserción del gen de interés en el vector de expresión
Epítotope myc en el C-terminal (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-	Permite la detección de proteínas de fusión mediante el anticuerpo anti-myc
Cola de polihistidina en el C-terminal	Permite la purificación de la proteína mediante resinas quelantes de metales como níquel
Terminación de transcripción AOX1	Terminación de la transcripción y señal de poliadenilación nativa del gen AOX1 (260pb)
Promotor de TEF1	Promotor del gen del factor de elongación de la transcripción 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> que conduce la expresión del gen <i>Sh ble</i> en <i>Pichia</i> , confiriendo resistencia a Zeocina
EM7 (promotor procarionota sintético)	Promotor constitutivo que conduce la expresión del gen <i>Sh ble</i> en <i>E. coli</i> , confiriendo resistencia a Zeocina
Gen <i>Sh ble</i> (gen ble de <i>Streptoalloteichus hindustanus</i>)	Gen de resistencia a zeocina
Región de terminación de la transcripción CYC1	Extremo 3' del gen CYC1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> que permite un procesamiento eficiente del 3' mRNA del gen <i>Sh ble</i> para incrementar su estabilidad
Origen pUC	Permite la replicación y el mantenimiento del plásmido en <i>E. coli</i>
Sac I Pme I bstX I	Sitios de restricción únicos que permiten la linearización del vector en el locus de AOX para una integración eficiente en el genoma de <i>Pichia</i>

Fuente: Cereghino & Cregg, 2000

Purificación de proteínas mediante una cola de histidinas

En los últimos años se han desarrollado todo un conjunto de vectores y sistemas que permiten la expresión de genes fusionados a secuencias marcadoras que posibilitan por un lado la identificación y cuantificación de la proteína formada, y por otro, su purificación mediante cromatografía de afinidad. Una de las secuencias marcadoras más utilizadas es la denominada cola de histidinas (His-tag por sus siglas en inglés), ya que introduce seis residuos de histidinas consecutivos, bien en el extremo N-terminal, bien en el extremo C-terminal de la proteína. Los vectores de expresión están diseñados para que al insertar el gen de interés en el sitio múltiple de clonación, la secuencia del vector que codifica la cola de polihistidinas quede fusionada a uno de los extremos de la proteína. Esto facilita su identificación mediante análisis inmunológicos (Western blot) con anticuerpos comerciales antihistidinas y su purificación mediante cromatografía de afinidad en geles de agarosa con níquel-ácido nítrico triacético que retienen específicamente a las proteínas con histidinas porque estos residuos quedan unidos al níquel. La proteína de interés se eluye finalmente con imidazol.

3. Justificación e Hipótesis

Justificación

El potencial de aplicación de las cutinasas es interesante, representando una alternativa al uso de lipasas y esterases. Se conocen pocos modelos y *Aspergillus nidulans* constituye un ejemplo interesante al estar muy estudiado, y contar con su genoma completo. En éste existen cuatro cutinasas putativas, de las que el grupo de trabajo ha identificado dos. Con el fin de contar con mayor información sobre sus propiedades bioquímicas y catalíticas, así como de tener material para su posible sobreexpresión, resulta indispensable la purificación y caracterización de las mismas.

La estrategia a evaluar consistiría en un procedimiento de purificación tradicional, o en el aislamiento de los genes y su producción en sistemas recombinantes para proceder a su sobreexpresión, purificación y caracterización.

En este trabajo se caracterizará bioquímica y cinéticamente la cutinasa de 29 kDa. Los resultados se compararán con los obtenidos en otro estudio del grupo de trabajo relativo a las propiedades de la cutinasa de 22 kDa. Por otra parte, se aislarán los genes que codifican ambas enzimas, se realizará un estudio *in silico* de su posible regulación y se realizarán ensayos de expresión en un sistema heterólogo. Si éste resultara exitoso, se podría tener material para la caracterización bioquímica; de otra manera, se buscarán otras técnicas

Hipótesis

Será posible obtener a la cutinasa de 29 kDa producida por *Aspergillus nidulans* PW1 a partir del extracto crudo de un medio que contiene aceite de oliva como inductor. Esta cutinasa podrá ser purificada y caracterizada bioquímica y cinéticamente para explicar sus propiedades y potencial en biocatálisis.

4. Objetivos

Objetivo general:

Determinar las propiedades bioquímicas, cinéticas y regulatorias de la cutinasa de 29 kDa producidas por *A. nidulans* y compararlas con las propiedades de la cutinasa de 22 kDa.

Objetivos particulares:

Purificar la enzima nativa 29 kDa y determinar sus propiedades bioquímicas y cinéticas

Compararlas con las obtenidas para la de 22 kDa en el grupo de trabajo

Aislar los genes de la enzima de 22 y 29 con el fin de a sobreexpresar las proteínas

Expresar los genes en un sistema heterólogo y, en su caso, determinar las diferencias entre las proteínas nativas y recombinante.

5. Materiales y métodos experimentales

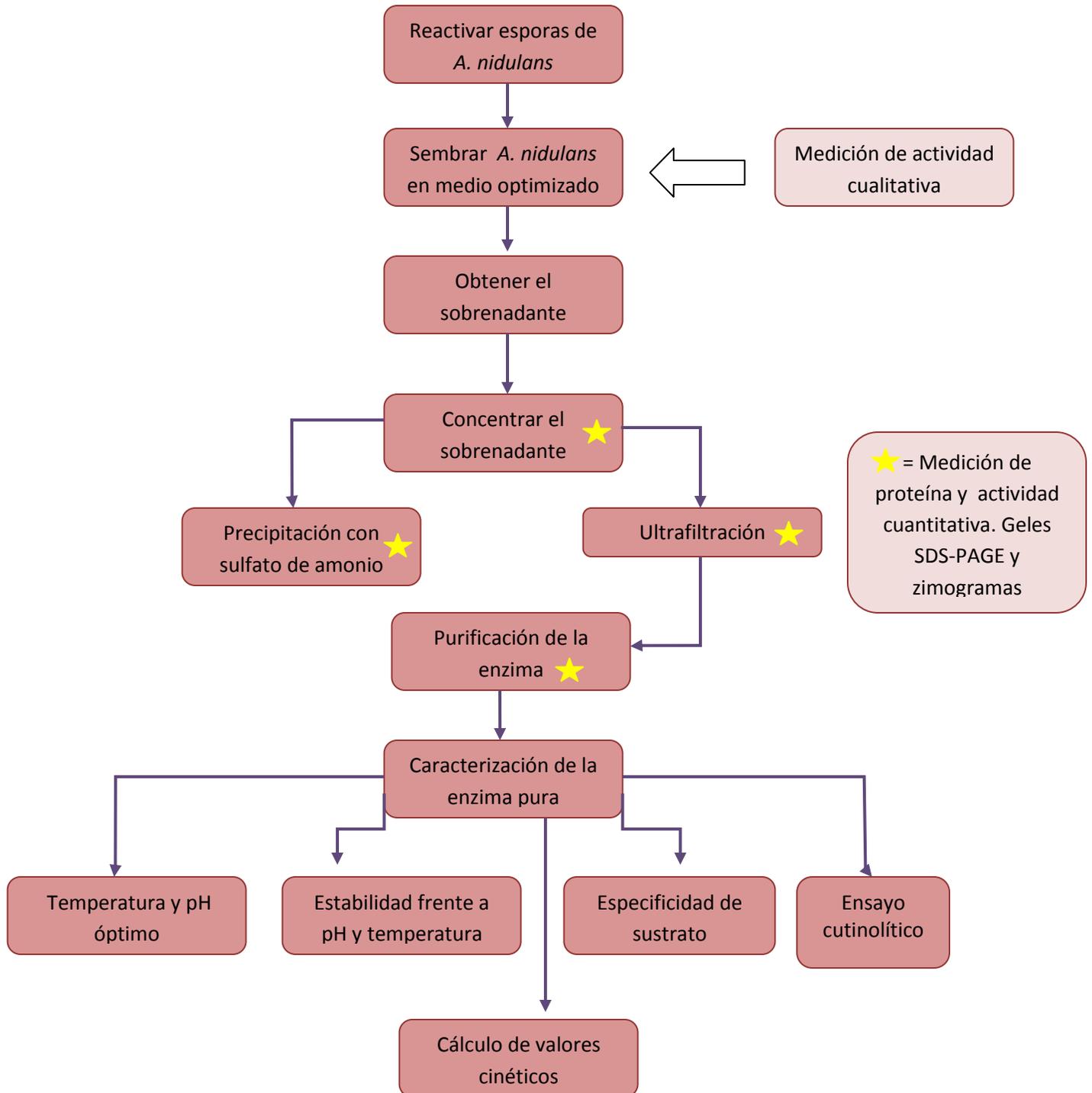


Figura 3.1: Caracterización de la enzima nativa de 29 kDa. Se ilustra el proceso de obtención, concentración, purificación y caracterización seguido en este trabajo.

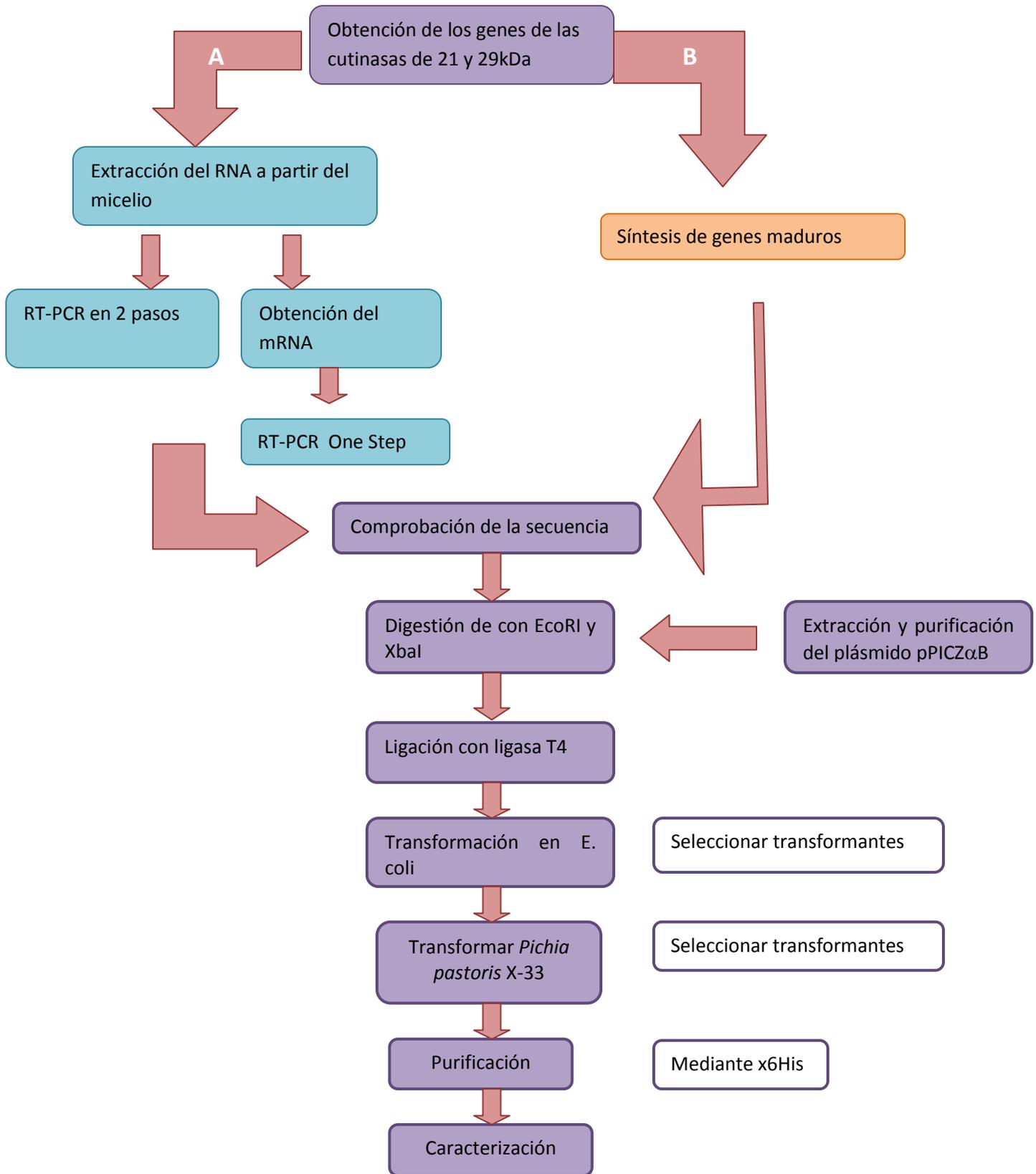


Figura 3.2: Obtención de los genes de las cutinasas de 22 y 29 kDa. Se ilustran los dos caminos a seguir para la obtención de los genes maduros y el proceso de clonación y expresión en *P. pastoris*.

Metodología:

Cepas utilizadas para la obtención, clonación y expresión de las cutinasas

Se utilizó la cepa PW1 de *Aspergillus nidulans* para la obtención de la proteína nativa Cut29 y para la obtención del ARN_m de los genes cut22 y cut29

Se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α para la estabilización de la construcción pPICZ α Bcut21

Se utilizó la cepa de *Pichia pastoris* X-33 para la expresión del vector pPICZ α Bcut21-2

Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las cepas

Se utilizó el medio mínimo optimizado para la producción de la cutinasa de 29 kDA en *A. nidulans* PW1, el cual utiliza como fuente inductora el aceite de olivo (Castro-Ochoa et al., 2012).

Se utilizó el medio LB bajo en sales adicionado con Zeocina para el crecimiento de *E. coli* DH5 α transformada con el vector pPICZ α Bcut21; así como cajas de agar LB bajo en sales, adicionado con Zeocina.

Para la expresión de la cutinasa de 22 kDA en *P. pastoris* X-33 se utilizaron los medios YPD, YPD adicionado con Zeocina, BMGY adicionado con Zeocina y BMMY adicionado con Zeocina.

La composición de los medios anteriores y los otros mencionados posteriormente se encuentra descrita en el Anexo A.

Reactivación de la Cepa de *Aspergillus nidulans* PW1

Se cosecharon esporas de *A. nidulans* en medio mínimo (Käafer, 1977) que fueron resuspendidas en una solución de leche descremada al 5 % para su conservación en sílica gel a 4°C (Vergara, 2010). Posteriormente se sembraron gránulos de sílica gel en cajas de medio mínimo y se incubaron estas cajas durante 7-9 días para realizar una cosecha y conteo de esporas utilizando una cámara de Neubauer (Anexo B).

Cultivo del hongo y producción de la enzima

Preparación de los medios de cultivo

Medio para cutinasa 22 kDa		Medio para cutinasa 29 kDa	
Componente	Concentración	Componente	Concentración
Sales 20x	50 mL/L	Sales 20x	50 mL/L
Elementos traza	1 mL/L	Elementos traza	1 mL/L
Arginina	5 mL/L	Extracto de levadura	0.5%
Biotina	500 µL/L	Arginina	5 mL/L
Metionina	11 mg/L	Biotina	500 µL/L
Glicerol	0.1%	Metionina	11 mg/L
Cutina	0.3%	Sacarosa	0.5%
		Aceite de olivo	0.5%

Se inocularon los medios con 1×10^6 esporas cada uno y se incubaron 24 y 48 h respectivamente. El micelio obtenido de la fermentación se filtró, se lavó con buffer para inhibir ARNsas y se congeló en nitrógeno líquido para extracción de ARN y el sobrenadante se congeló para llevar a cabo la purificación de la enzima nativa.

El sobrenadante al vacío con papel filtro no. 1 Whatman en un embudo buchner y se le determinó concentración proteína así como actividad enzimática (cualitativa y cuantitativamente, como se explica a continuación).

Técnicas Bioquímicas

Determinación de proteína por el método Bradford en microplaca

Se utilizó el ensayo de Bradford (Bradford, 1976). Se hizo una dilución de la muestra (generalmente 1:10) con agua destilada; salvo en algunos ensayos en los que por la baja

concentración se midió la muestra directamente. Se colocaron en la microplaca 160 μL de la dilución o de agua destilada en caso del blanco y 40 μL del reactivo de Bradford (Biorad) y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se determinaron las concentraciones en el espectrofotómetro Epoch (Biotek) utilizando el software Gen5 1.10, con una curva patrón de albúmina sérica bovina (ABS) (Anexo D).

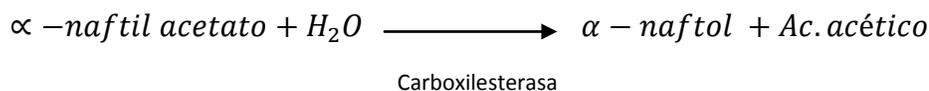
Determinación de actividad cualitativa con Acetato de α -Naftilo

Se preparó un stock de acetato de α -Naftilo (Sigma), pesando 2 mg del reactivo y disolviéndolo en 0.5 mL de acetona. Se llevó a un volumen de 2 mL con buffer de fosfatos 50 mM pH 7.

También se preparó el stock de Fast Red pesando 5 mg del reactivo y disolviéndolo en 0.5 mL de buffer de fosfatos 50 mM pH 7 con 50 μL de Tritón 100-X para solubilizar y se llevó a 2 mL con el mismo regulador.

Se colocó en una microplaca 50 μL de la muestra a medir (o regulador en el caso del blanco), y se añadieron 50 μL del stock de acetato de α -Naftilo. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 min y después se añadieron 50 μL del stock de Fast Red (Sigma) para observar la intensidad de la coloración rojiza obtenida.

El fundamento de esta reacción consiste en que las enzimas con actividad de esterasa hidrolizan acetato de α -Naftilo liberando α -naftol, el cual reacciona con el Fast Red, que es una sal de diazolio, para formar un cromógeno de color rojo:



Determinación de actividad cuantitativa con p-NPA (y otros p-NPésteres)

Se preparó un stock de p-NPA 10 mM en etanol del cual se tomaron 100 μL y se añadieron 900 μL de agua para preparar el sustrato a una concentración de 1 mM.

Se colocaron de 10 μL de la muestra a medir en la microplaca y se añadieron 170 μL de buffer de fosfatos 50 mM pH 7. En el caso del blanco de autohidrólisis, se sustituyó la muestra por regulador de fosfatos.

Justo antes de medir, se añadieron 20 μL del stock 1 mM de p-NPA, mezclando rápidamente y se monitoreó la cinética de hidrólisis a 420 nm durante 10 min, realizando

mediciones cada minuto, según lo indicado en el protocolo del software Gen 5 1.10 del espectrofotómetro Epoch (Biotek) (Nawani, 2006; Bornscheuer et al., 2005).

Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto. La cantidad de acetato de *p*-nitrofenilo (*p*-NPA) se interpoló en una curva patrón de *p*-NP (Anexo E).

Perfil electroforético

Preparación de geles SDS-PAGE y determinación de actividad por zimogramas

Se hicieron geles de electroforesis desnaturalizantes según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles se hicieron de tipo discontinuo utilizando un gel concentrador al 4% y uno separador al 14% de poliacrilamida.

Las muestras se precipitaron con TCA para ajustar a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se hirvieron 5 min y se cargaron 20 μL en cada pozo. La electroforesis se corrió a 80 y 120 mV en una cámara MiniProtean II de Biorad y los geles se revelaron con nitrato de plata.

Para los zimogramas de actividad, se llevó a cabo una renaturalización de los geles realizando un lavado de 30 min con regulador de fosfatos 50 mM pH 7 y Tritón X-100 al 5% durante media hora, incubando con agitación. Luego se lavó nuevamente con buffer de fosfatos 50 mM pH 7 y se incubó durante otros 30 min antes de añadir el stock de α -NA e incubar por 15 minutos. Por último se agregó el reactivo revelador Fast Red y cuando las bandas se observaron a la intensidad adecuada, se cambió la solución reveladora por buffer de fosfatos 50 mM pH 7.

Tinción con plata

Para la tinción con plata, los geles se dejaron toda la noche en solución fijadora con 30% de etanol y 10% de ácido acético. Al otro día, se realizaron 2 lavados con etanol al 30% durante 30 min cada uno y después 2 lavado con agua desionizada durante 10 min cada uno. Se agregó la solución de plata que consiste en 250 μL de un stock de Nitrato de Plata al 20% en 50 mL de agua desionizada y se incubó durante 30 min con agitación. Luego se hicieron 2 lavados con agua desionizada durante 40 s y se reveló con una solución de carbonato de sodio 2.5%/formaldehído 37% durante un periodo de 4 a 6 min o hasta la aparición de bandas ópticas. Al final se enjuagó con agua desionizada.

Concentración de la enzima

Se siguieron dos métodos para la concentración de la proteína: la ultrafiltración y la precipitación mediante sulfato de amonio. Por tanto, el volumen total de extracto crudo (400 mL) se dividió en dos partes.

Precipitación con sulfato de amonio

Se filtraron los sobrenadantes de los cultivos y se colocaron en un baño de hielo sobre una parrilla en agitación. Se añadió lentamente sulfato de amonio hasta una concentración de 65%. Conforme se iba acercando el punto saturación se añadió más lentamente la sal. Se continuó agitando durante 30 min después de que toda la sal se hubo añadido y posteriormente se centrifugó la solución a 8500 rpm durante 10 min. Después se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1-2 volúmenes de regulador pH 7.

Diálisis de la enzima

Posteriormente para eliminar el sulfato de amonio se dializó la enzima precipitada utilizando una membrana de corte de 14 kDa y se ultrafiltró utilizando una membrana de 1 kDa.

Ultrafiltración

Se realizó una ultrafiltración del extracto crudo en Amicon (Millipore) con membranas YM de límite de exclusión de 10 y 1 kDa en baño de hielo. Se partió de 250 mL de extracto y se utilizó una membrana de 10 kDa para concentrar la muestra reduciendo su volumen hasta 15 mL. Inmediatamente después se utilizó una membrana de 1 kDa para reducir estos 15 mL aproximadamente 10 veces hasta un volumen final de 1.5 mL.

Purificación de la enzima

Se llevó a cabo la purificación del sobrenadante dializado o ultrafiltrado mediante una columna de poliacrilamida utilizando el equipo Mini PrepCell (BioRad) (Anexo F). Se prepararon soluciones de acrilamida, buffer de fosfatos pH 8.8 y 6.8 así como agua

desionizada filtrada y esterilizada. Se desgasificaron en un matraz Kitazato conectado al vacío y en agitación durante 15 min. Para la preparación del gel, primero se niveló la base del gel utilizando los tornillos y se fijó a la base grande donde se apoyará. Se preparó el gel separador al 14% según el manual y se vació dentro de la base del gel con ayuda de una jeringa, lentamente para no formar burbujas. Se añadió 1 mL de isopropanol y se dejó polimerizar el gel durante 2 h. Luego de ese tiempo, se eliminó el isopropanol y se añadió más regulador pH 8.8 dejándolo al gel polimerizar completamente hasta el otro día.

Al día siguiente se desechó el buffer y se preparó el gel concentrador al 4% con las soluciones desgasificadas. Este se vació sobre el gel separador con una jeringa o punta y se dejó polimerizar durante 2 h. Una vez listo el gel, se ensambló el resto del equipo: el “harvest ring” junto con la membrana y el “frit” se colocaron en el soporte correspondiente, (purgando el sistema con ayuda de una jeringa llena de regulador hasta que no salieran burbujas) y se unieron a la base del gel, apretando los tornillos uniformemente hasta que no hubiera fugas y el regulador saliera a través de la manguera que se conecta a la base del gel. Después se unió la base del gel a la cámara de electroforesis y se conectó la manguera a la cámara interior. Se purgó la manguera hasta que el buffer salió dentro de la cámara inteARN. Antes de cargar, se llenaron la cámara inteARN y la exteARN con 100 mL de buffer de corrida y la cámara de abajo con 400 mL y después se inyectó la muestra dentro del tubo contenedor del gel previamente disuelta en buffer de carga desnaturalizante y hervida por 5 min.

Por último, se tapó la cámara y se conectaron los electrodos a la fuente de poder. Además se conectó la manguera de la cámara a la de la bomba y la otra manguera de la bomba hacia el colector previamente purgado con buffer de corrida.

Se fijó el flujo de la bomba en 0.1 mL/minuto y el tiempo del colector en 2.5 min. Por último se encendió la fuente de poder, se seleccionó modo manual y se fijó el voltaje constante en 1 y el tiempo en 5 horas.

Para iniciar la corrida, se oprimió el botón de “run” en la fuente de poder y en la bomba y cuando comenzó a salir el frente de corrida se inició la colecta de las fracciones.

Se evaluó cantidad de proteína y actividad con α -NA a todas las fracciones colectadas. La pureza de la enzima se evaluó en geles SDS-PAGE teñidos con plata.

Caracterización de la enzima pura

Nota: Todos los ensayos se realizaron por triplicado

Determinación de la temperatura óptima del ensayo

Para determinar la temperatura óptima del ensayo, la actividad enzimática fue medida por triplicado espectrofotométricamente en microplaca durante 10 min a 30, 40, 50, 60 y

70 °C a pH 7.2 corriendo a la par siempre un blanco de autohidrólisis de cada condición. Se incubaron a cada temperatura 10 µL de enzima en 170 µL de buffer y se añadieron 20 µL de sustrato *p*-NPA 1 mM. Se monitoreó la reacción cada 2 min durante 10 min, utilizando la misma técnica reportada en el apartado de cuantificación de actividad enzimática. Con los parámetros obtenidos de esta medición fue posible calcular la Energía de Activación (E_a) de la enzima.

Determinación de la estabilidad térmica

Para determinar la estabilidad térmica de la cutinasa, se incubó una solución de la misma sin sustrato en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.2 a temperaturas de 30, 40, 50, 60 y 70°C durante intervalos de tiempo de 15, 30 y 60 min. Posteriormente se dejó que la solución alcanzara la temperatura ambiente y se monitoreó su actividad frente a *p*-NPA por el método ya descrito.

Determinación del pH óptimo

Para determinar el pH óptimo, la actividad enzimática frente a *p*-NPA fue medida a diferentes valores de pH desde 5 hasta 11. Los buffers utilizados fueron: para los pHs de 4 y 5, buffer de acetatos 50 mM, para los pHs 6-7, buffer de fosfatos 50 mM, para los pHs 8 y 9 buffer Tris-HCl 50 mM y para los pHs 10 y 11 buffer CAPS 50 mM.

Determinación de la estabilidad a pH

Utilizando los mismos buffer que en el punto anterior, se probó la estabilidad de la enzima frente al pH. La enzima suspendida en cada buffer se incubó durante 1 y 3 horas. Posteriormente se determinó su actividad frente a *p*-NPA en microplaca como en los ensayos anteriores.

Especificidad frente a sustratos

Se determinó la actividad específica de la enzima frente a *p*-NP ésteres de cadena corta, media y larga. Los ensayos se llevaron a cabo a pH 8 y a 37°C para favorecer la disolución de los sustratos sin que la autohidrólisis fuera excesiva. Los *p*-NP ésteres probados fueron *p*-NPAcetato (*p*-NPA), *p*-NPButirato (*p*-NPB), *p*-NPMiristato (*p*-NPM), *p*-NPLaurato (*p*-NPL), *p*-NPPalmitato (*p*-NPP) y *p*-NPEstearato (*p*-NPE) y cubrieron un largo de cadena de 2 a 18 C.

Efecto de iones frente a la actividad enzimática

Se determinó la actividad de la cutinasa de 29 kDa en presencia de varios iones metálicos, para determinar si alguno de ellos actúa como co-factor de la enzima. Los iones utilizados (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ y Cu^{2+}) se añadieron a la enzima resuspendida en buffer Tris-HCl 50 mM pH 9 a una concentración de 1 y 10 mM, y la solución se incubó durante 24 h a 4°C. Transcurrido este tiempo, se midió la actividad frente a *p*-NPA en ensayos de microplaca igual que en las otras determinaciones. La actividad residual se calculó utilizando como 100% la actividad de la enzima en buffer pH 9 sin iones añadidos.

Efecto de posibles inhibidores en la actividad enzimática

Se evaluó el efecto de algunos de los inhibidores reportados para cutinasas (Chen et al., 2010) sobre la actividad enzimática de la cutinasa de 29 kDa. Los compuestos utilizados (SDS, DMSO y Tween 80) se añadieron en concentraciones de 1 y 10 mM a la enzima resuspendida en buffer Tris-HCl pH 9 y se incubaron durante 24 h a 4°C. Posteriormente se cuantificó la actividad frente a *p*-NPA y se reportó la actividad residual utilizando como 100% la actividad obtenida sin la adición de ningún surfactante.

Efecto de solventes en la actividad enzimática

Se evaluó el efecto de diferentes solventes en la actividad enzimática de la cutinasa de 29 kDa frente a *p*-NPA. Los solventes utilizados (acetona, etanol, hexano, isopropanol y DMSO) se añadieron en concentraciones de 30 y 50% a la cutinasa solubilizada en buffer Tris-HCl pH 9 50 mM y se incubaron durante 24 h a 4°C antes de medir la actividad residual espectrofotométricamente. Se consideró como 100% de actividad a la enzima incubada en el mismo buffer sin la adición de solvente alguno.

Determinación de las constantes cinéticas

Se determinaron las constantes cinéticas k_m , k_{cat} y k_m / k_{cat} para la cutinasa de 29 kDa. Primero se determinó la actividad específica frente a *p*-NPA a diferentes concentraciones de sustrato utilizando el ensayo espectrofotométrico descrito anteriormente. La velocidad inicial fue calculada utilizando la región lineal de la curva de reacción (5 min). Las constantes cinéticas aparentes fueron calculadas a partir de una gráfica de dobles inversos ($1/v$ vs. $1/[pNPA]$) y son el resultado del promedio de tres mediciones independientes.

Determinación de sitios de glicosilación

Se realizó un ensayo para detectar posibles sitios de glicosilación en la cutinasa de 29 kDa utilizando el protocolo descrito para kit DIG Glycan Differentiation (Roche). El fundamento de este ensayo es el mismo que el de una réplica en Western, ya que utiliza diferentes leucinas acopladas a un anticuerpo. La leucina reconoce un único tipo de azúcar por lo que una reacción positiva indica a qué azúcar está unida la proteína de interés; es necesario utilizar controles positivos para cada una de las leucinas.

Técnicas biocatalíticas

Evaluación de la actividad hidrolítica sobre cutina

Se resuspendieron 5 mg de cutina en 300 μ L de tolueno hasta su disolución y se añadieron 700 μ L de una dilución 2.5 de la enzima pura para un volumen final de reacción de 1 mL con 50U de enzima. Además se hizo un blanco de reacción en el que no se añadió la enzima. Se incubaron las reacciones durante 72 h a 37°C y 100 rpm en viales sellados. Posteriormente se revelaron los productos de hidrólisis por Cromatografía en Capa Fina (CCF) utilizando como fase móvil éter de petróleo:diel éter:ácido acético (60:40:1 v/v) Los productos se visualizaron en una cámara de UV utilizando como agente revelador diclorofluoresceína.

Técnicas moleculares

Identificación de los genes correspondientes de las cutinasas

Se buscaron en la base de datos del genoma de *Aspergillus nidulans* las secuencias de los genes correspondientes a las dos cutinasas estudiadas en el presente trabajo. Se verificó que su secuencia de aminoácidos correspondía a la reportada anteriormente (Castro-Ochoa et al., 2012; Esqueda, 2012).

Diseño de cebadores

Se diseñaron cebadores específicos para amplificar los genes de las 2 cutinasas de *A. nidulans* (AN5309 para la cutinasa de 21 kDa y AN7541 para la cutinasa de 29 kDa) utilizando el software OlygoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtADN.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) y analizando las secuencias reportadas en la base de datos del genoma de *Aspergillus nidulans* (Galagan et al., 2005). Se insertaron sitios de corte para las enzimas Eco RI en el extremo 5' y para Xba I en el 3'.

Extracción de ARN y RT-PCR

Para la extracción de ARN total se utilizó el Kit RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN); siguiendo el protocolo específico descrito por el proveedor para tejido vegetales y hongos filamentosos. Se pesó 1 g de micelio congelado en nitrógeno líquido y se colocó en un mortero. Se añadió sílica gel estéril para romper el tejido hasta formar un polvo. El polvo se colocó en un eppendorf de 2 mL dejando evaporar los restos de nitrógeno líquido. Se agregaron 450 µL de buffer RLC precalentado a 56°C, se homogenizó bien y se transfirió la mezcla a una columna para lavados.

Se centrifugó por 2 min a máxima velocidad y se transfirió cuidadosamente el sobrenadante a un nuevo tubo de centrifuga. Se agregaron 0.5 volúmenes de etanol absoluto para limpiar el lisado y se mezcló bien para transferir la mezcla a la columna de unión en un tubo colector de 2 mL. Se centrifugó durante 15 s a máxima velocidad (12000 rpm) y se descartó el sobrenadante. Luego se adicionaron 700 µL de buffer RWI a la columna y se centrifugó 15 s a 12000rpm desechando el sobrenadante. Se añadieron 500 µL de buffer RPE a la columna y se centrifugó en las mismas condiciones, repitiendo el paso anterior. Por último se centrifugó a máxima velocidad 1 minuto para eliminar los restos de etanol en la columna y se colocó la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL al que se agregaron 30-50 µL de agua libre de ARNsas en el centro de la membrana. Se centrifugó 1 minuto a 12000 rpm para eluir el ARN. Se corrieron geles de agarosa y formaldehído para verificar la integridad del ARN obtenido

Utilizando la enzima M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) se utilizó el ARN aislado para la síntesis de cADN mediante una RT-PCR. Se emplearon cebadores oligoT (Fermentas), los cuales reconocen la secuencia poliA de los ARNs mensajeros y, a partir de ellos, la transcriptasa reversa sintetiza una hebra de ADN complementaria o madura. La síntesis de ADN se realizó utilizando la siguiente mezcla de reacción:

a) Mezcla de reacción*:

Componente	Volumen
ARNtemplado	2 µL
Cebadores dT (10 µM)	1 µL c/u
Agua libre de ribonucleasas	Para 11.5 µL
Calentar a 65°C por 5 min, colocar en hielo inmediatamente	
Buffer de reacción 5X	4 µL
Inhibidor de ARNsas	0.5 µL
dNTP mix 10 mM	2 µL
M-MuLV (Transcriptasa reversa)	2 µL
Incubar 60 min a 45°C	

Para parar la reacción calentar a 70°C por 10 min

*Según lo indicado por el fabricante en el apartado de Protocolos y Recomendaciones (Fermentas)

Una vez obtenido el cADN, se utilizó este como templado en una PCR utilizando la enzima Pfu polimerasa (Fermentas) para la amplificación del ADN maduro de cada uno de los genes, utilizando el siguiente protocolo:

b) Mezcla de reacción:

Componente	Volumen
Buffer de reacción	5 µL
dNTPs	1 µL
Primer forward (10 µM)	1 µL
Primer reverse (10 µM)	1 µL
ADN templado	2 µL
Agua BM	Para 50 µL
Pfu ADN polimerasa	0.5 µL
Total	50 µL

Para la extracción de ARNm se utilizó el Kit Dynabeads mARN Direct (QIAGEN), bajo el protocolo recomendado por el proveedor.

Se trituró el tejido o micelio previamente congelado en Nitrógeno líquido en un mortero con perlas de vidrio. Se colocó en un tubo eppendorf y se añadió el buffer de lisis. Se homogenizó durante 1-2 min.

Por otro lado, se resuspendió la solución de Dynabeads y se transfirió el volumen a un tubo de 1.5 mL. Se acercó el magneto durante 30s y después de ese tiempo se removió el sobrenadante. Se retiró el magneto y se lavó con un mismo volumen de buffer (nuevamente remover el buffer utilizando el magneto para no remover los Dynabeads). A la solución con dynabeads se añadió el tejido lisado y se incubó de 1 a 3 minutos a temperatura ambiente. Se acercó el magneto al tubo para remover el sobrenadante y se lavaron los Dynabeads que han unido el ARNm con buffer de lavado A 2 veces a temperatura ambiente y 1 vez los Dynabeads/ARNm con el buffer B. Se añadió regulador Tris-HCl precalentado a 65-80°C 2 min. Y por último se acercó el magneto para transferir el sobrenadante a un nuevo tubo tratado con DEPC. El mARN se encuentra en el tubo nuevo. Con el mARN aislado, se corrió una RT-PCR en un solo paso con la SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq ADN Polimerasa (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

a) Mezcla de reacción*:

Componente	Volumen
2X Reaction Mix	12.5 μ L
ARN templado (0.01 pg- 1 μ g)	2 μ L
Primer forward (10 μ M)	1 μ L
Primer reverse (10 μ M)	1 μ L
SuperScript III RT/Platinum <i>Taq</i> Mix	1 μ L
Agua libre de ARNsas	Para 25 μ L

*Según lo recomendado por el fabricante (Invitrogen, Protocols and Recommendations)

b) Condiciones de reacción:

Etapa	No. de ciclos	Temperatura	Tiempo
Síntesis de cADN	1	55 °C	30 min
Desnaturalización	1	94 °C	2 min
PCR amplificación	40	94 °C	15 s
		60 °C	30 s
		68 °C	1 min
Extensión final	1	68 °C	5 min

Preparación de geles de agarosa

Se pesaron los gramos de agarosa necesarios para la concentración deseada (1%) y se añadió buffer TAE 1X calentando en microondas hasta su completa disolución.

Se vertió en una probeta 30 μ L de agarosa y se agregaron 10 μ L de bromuro de etidio con concentración de 10 mg/mL por cada 100 mL de agarosa. La solución se sirvió en la bandeja de corrida vertiendo la solución lentamente por uno de los extremos de la bandeja y se dejó polimerizar la agarosa.

Una vez polimerizada, se retiró el peine y se cargaron las muestras de interés con buffer de carga "Loading Dye" (Invitrogen) y el marcador de peso molecular en el gel. Se corrió el gel a 80 mV y se reveló sobre un transiluminador de luz UV.

Síntesis de genes

Los genes maduros de ambas cutinasas: AN5309 para la cutinasa de 21 kDa y AN7541 para la cutinasa de 29 kDa, se sintetizaron por la compañía Epoch Biolabs a partir de sus secuencias, reportadas en la base de datos del genoma de *Aspergillus nidulans*, utilizando el servicio de Gene Synthesis. Los genes fueron entregados filtrados sobre papel filtro, del que se extrajeron utilizando buffer TE y agitación durante 2 h.

PCR con cebadores específicos

Los genes de ambas cutinasas se amplificaron mediante PCR utilizando la enzima Pfu polimerasa (Fermentas) nuevamente bajo el siguiente protocolo:

a) Mezcla de reacción y condiciones de reacción:

Componente	Volumen
Buffer de reacción	5 µL
dNTPs	1 µL
Primer forward (10 µM)	1 µL
Primer reverse (10 µM)	1 µL
ADN templado	2 µL
Agua BM	Para 50 µL
Pfu ADN polimerasa	0.5 µL

Etapas	No. de ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	1	94 °C	2 min
Amplificación	40	94 °C	15 s
		60 °C	30 s
		72 °C	1 min
Extensión final	1	72 °C	5 min

* Según lo reportado por el fabricante (Fermentas) en Protocols & Recommendations

Purificación de bandas de ADN a partir de geles de agarosa

Se utilizó el Kit GenElute Minus EtBr Spin Columns (Sigma) y se siguieron las especificaciones recomendadas por el proveedor. Se añadieron 100 µL de buffer 1xTE a una columna de purificación. Se centrifugó a velocidad máxima durante 5-10 seg y se desechó el líquido eluído. Se añadió la banda de ADN a la columna pre-lavada (cortada en pedazos pequeños) y se centrifugó a máxima velocidad 10 min. El ADN está en el tubo colector.

Precipitación de ADN

Al ADN obtenido se añadieron 0.1 volúmenes de Acetato de Sodio 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de Etanol absoluto y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente o 12 h a -20°C para precipitarlo. Se centrifugó el tubo a velocidad máxima durante 15 min y se descartó el sobrenadante. El ADN se lavó con Etanol al 70% y se centrifugó a velocidad máxima por 5 min para resuspender el pellet en agua o buffer TE.

Construcción de los plásmidos pPICZαBcut22 y pPICZαBcut29

Los fragmentos amplificados y purificados de cada uno de los genes se digirieron con EcoRI y Xba I y se insertaron en el plásmido pPICZαB previamente digerido con las mismas enzimas utilizando la ligasa T4 de Fermentas o de New England Biolabs (NEB) para generar el correspondiente vector pPICZαBcut22 o pPICZαBcut29. La mezcla de reacción* para los genes de cutinasa consistió en:

Componente	Concentración en mezcla	Volumen final
Buffer Tango (10X)	2X	10 µL
XbaI	2.5U	0.25 µL
NcorI	2.5U	0.25 µL
ADN	300 ng	
Agua		c.b.p. 50 µL
Volumen final		50 µL

Y para el plásmido pPICZαB*:

Componente	Concentración en mezcla	Volumen final
Buffer Tango (10X)	2X	4 µL
XbaI	2.5 U	0.25 µL
EcoRI	2.5 U	0.25 µL
ADN	250 ng	
Agua		c.b.p. 20 µL
Volume final		20 µL

*Según las recomendaciones dadas por el fabricante (Fermentas) en el apartado Double Digest de su página en línea (<http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>)

La ligación de los fragmentos digeridos se llevó a cabo utilizando dos T4 ADN ligasas de diferente proveedor (Fermentas y NEB). Los protocolos para cada uno de los ensayos de ligación se enlistan debajo. Para la ligasa T4 de Fermentas las condiciones de reacción fueron:

Inserto	250 ng
Plásmido	50 ng
Buffer de enzima	1x
Ligasa T4	2.5 U
Agua	Cbp 40 µL

*Según las recomendaciones de uso del fabricante (Fermentas)

A 16°C durante 12 h e inactivando a 70°C por 5 min.

Los productos de la doble digestión se ligaron con la ligasa de T4 (New England Biolabs) bajo las siguientes condiciones:

Componente	Concentración
Inserto	100 ng
Plásmido	30 ng
Buffer de enzima (10X)	1x
Ligasa T4 NEB	2.5 U
Agua	cbp 50 µL

*Según la hoja de recomendaciones del fabricante (NEB)

Durante 1h a 22°C e inactivándose durante 10 min a 70°C.

Una vez obtenidos los vectores se transformaron en células electrocompetentes de *E. coli* DH5α

Preparación de células competentes para transformación en *E. coli*

Se inoculó 1 tubo con 5 mL de medio Luria-Bertani con 100 µL de células de *E. coli* DH5α y se dejó crecer toda la noche. Se inocularon 200 mL de LB con una dilución 1:100 del cultivo anterior y se dejó crecer hasta una O.D. de 0.5-0.7 (aproximadamente 4 h). Para luego centrifugar 15 min a 6000 rpm y 4°C y eliminar el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 5 mL de agua pre-enfriada y luego se adicionaron 200mL más. Se centrifugó el tubo en las mismas condiciones del paso 3 y se repitió el lavado con agua pre-enfriada una vez más. Por último, se resuspendió el pellet en 20 mL de glicerol al 15%, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante para resuspender el pellet en 1 mL de glicerol al 15% y hacer alícuotas de 80 µL repartidas en tubos eppendorf de 0.6mL. Las células se almacenaron a -70°C.

Transformación de *E. coli*

Se adicionaron 1-2 μL de plásmido o 10 μL de la mezcla de ligación a 80 μL de células competentes. Se incubó la mezcla durante 5 min en hielo y se transfirieron las células a una cubeta de electroporación de 0.2cm de diámetro pre-enfriada en hielo para ser transformadas en un electroporador Gene Pulser de Bio-Rad a 200Ω , 25 μF y 2.5 kV.

Después del pulso, se adicionó inmediatamente 1 mL de medio SOC y se transfirió la mezcla a un eppendorf de 2 mL para incubar por 45-60 min a 37°C y 200 rpm. Se centrifugó el tubo durante 10 min a 12000 rpm y se eliminó el sobrenadante para resuspender el pellet en 200 μL de medio SOB y plaquear sobre cajas de agar LB bajo en sales adicionado con Zeocina a una concentración de 100 ng/ μL . Se seleccionaron colonias crecidas en las placas para inocular tubos de medio LB bajo en sales que se incubaron 12h a 37°C y 200 rpm.

PCR de colonia

Se tomaron 100 μL del cultivo crecido en LB durante 12 h y se colocaron en un tubo eppendorf de 0.6 mL. Se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min para obtener el pellet que se resuspendió en 50 μL de agua grado biología molecular, para hervirlo durante 5 min y luego centrifugar 1 min a 14000 rpm. Se tomaron 15 μL del sobrenadante para utilizarlo como templado para una reacción de PCR de 25 μL siguiendo el mismo protocolo que el utilizado para la amplificación de los genes maduros.

Extracción de plásmido

Se realizó con el kit "Plasmid Midi Extraction kit" (Qiagen). Se colectó el pellet de las células centrifugando a 8000 g por 15 min a 4°C y se resuspendió en 4 mL de regulador P1. Se añadieron 4 mL de buffer P2, y se mezcló invirtiendo el tubo 4-6 veces. Incubar a temperatura ambiente 5 min. Se añadieron 4 mL de buffer P3 enfriado, y se mezcló inmediatamente por inversión y se incubó en hielo 15 min. Se centrifugó a 8500 g 1 h a 4°C y se removió el sobrenadante que contiene el plásmido y el ADN. Se centrifugó el sobrenadante a 8500 g por 30 min a 4°C y nuevamente se removió el sobrenadante. Se equilibró la columna QIAGEN tip100, aplicándole 4 mL de regulador QBT y se dejó que se vaciara por gravedad. Luego se colocó el sobrenadante y se dejó que entrara en la resina por gravedad. Se lavó la columna con 2x10 mL de buffer QC y se dejó vaciar por gravedad. Luego se eluyó el ADN con 5 mL de regulador QF y se colectó lo eluido en un tubo falcon de 15 o 50 mL. Se precipitó el ADN añadiendo 3.5 mL de isopropanol a temperatura ambiente y mezclando y centrifugando inmediatamente a 8500 g por 1 hora a 4°C . Se decantó el sobrenadante y se lavó el ADN (pellet) con 2 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente para después centrifugar a 8500 g por 10 min. Se decantó el

sobrenadante sin tocar el pellet y éste se dejó secar el pellet por 5 a 10 min para disolverlo en un volumen de regulador TE apropiado.

Expresión del vector pPICZ α Bcut21 en *Pichia pastoris*

El vector pPICZ α Bcut21 se linearizó utilizando la enzima PmeI según las recomendaciones del manual Easy Select Pichia (Cerenghino, 2000) y se purificó siguiendo el protocolo para purificación del kit “MinElute purification kit” (Qiagen). Para llevar a cabo la transformación fue necesario preparar células de *Pichia pastoris* electrocompetentes; se utilizó la cepa X-33 según las recomendaciones del manual.

Primero se creció a *P. pastoris* en 5 mL de YPD en un tubo de 50 mL a 30°C toda la noche sin agitación. A partir de este cultivo, se inocularon 500 mL de medio YPD en un matraz de 2 L con 500 μ L del preinóculo durante toda la noche hasta alcanzar una D. O. de 1.3-1.5. Se centrifugó el cultivo a 3500 rpm durante 5 min a 4°C y el pellet se suspendió en 500 mL de agua estéril pre-enfriada. Se repitió este paso, ahora con un volumen de sólo 250 mL y se volvió a centrifugar, ahora con 20 mL de sorbitol 1 M pre-enfriado. Por último, se centrifugó y se resuspendió el pellet en 1 mL de sorbitol 1 M. El volumen final de células lavadas se repartió en tubos eppendorf, colocando 80 μ L de células en cada uno. Estas células se mantuvieron en hielo y se usaron ese mismo día. No es posible congelarlas o guardarlas.

La transformación se llevó a cabo mediante electroporación. Se agregaron de 5 a 10 μ L del vector puro previamente linearizado con Pme I a 80 μ L de células electrocompetentes y se colocaron en una cubeta de 0.4 cm de diámetro pre-enfriada en hielo para incubarse durante 5 min. Se pulsaron las células a 25 μ F, 200 Ω y 200V y rápidamente se les adicionó 1 mL de sorbitol 1M pre-enfriado y se transfirieron a un tubo falcon de 15 mL. Las células transformadas se incubaron a 30°C durante 1-2 horas sin agitación. Por último se plaquearon en cajas de medio YPDS adicionado con Zeocina a una concentración de 100 ng/ μ L. Las cajas se incubaron de 2 a 3 días a 30°C y se seleccionaron colonias características para crecerlas en medio YPD adicionado con Zeocina (100 ng/ μ L) y Tributirina (1.5%) para observar halos de hidrólisis. A las colonias positivas se les extrajo el ADN para verificar mediante PCR la presencia del gen de interés.

Para la extracción de ADN de *Pichia pastoris* se siguió el protocolo recomendado en el manual Easy Select Pichia (Invitrogen) para obtener el ADN genómico de las clonas.

Se partió de una colonia crecida en 5 mL de medio YPD con zeocina; el pellet se obtuvo centrifugando a 3500 rpm durante 10 min. Se lavó el pellet con agua desionizada pre-enfriada y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Posteriormente se

resuspendió el pellet en 2 mL de buffer de lisis fresco. Se añadieron 0.1-0.3 mg de Zimolisina y se incubó la solución durante 50 min a 37 °C para generar los esferoplastos. Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 2 mL de SDS al 1%, se mezcló bien y se incubó la solución en hielo por 5 min; después se añadieron 1.5 mL de acetato de potasio 5 M pH 8.9 y la solución se mezcló antes de centrifugar a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se conservó y se desechó el pellet. A partir de este sobrenadante se llevó a cabo la precipitación del ADN utilizando la técnica de fenol-cloroformo. Es necesario realizar varios lavados hasta asegurarse de que el fenol ya no está presente en la solución para evitar interferencias al momento de cuantificar ADN. El ADN obtenido se utilizó como templado para PCR utilizando cebadores universales AOX. Las condiciones de esta reacción son las siguientes:

Reactivo	Volumen
Buffer de reacción 10x	5 µL
dNTPs	1 µL
5'AOX primer	1 µL
3'AOX primer	1 µL
Agua estéril	Cpb 50 µL
Lisado de células	5 µL

Y el programa utilizado en el termociclador fue el que se enlista a continuación:

Paso	Temperatura	Tiempo	No. ciclos
Desnaturalización	95°C	1 min	30X
Alineamiento	54°C	1 min	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	7 min	1X

*Según el manual Easy Select Pichia Expression Kit de Invitrogen

Se corrieron geles de agarosa para verificar el tamaño de los productos obtenidos

Para llevar a cabo la inducción de la cutinasa de 22 kDa en *P. pastoris*, se siguieron las recomendaciones básicas del manual Easy Select Pichia. A partir de una sola colonia de las clonas positivas, se inocularon 25 mL de medio BMGY en un matraz de 250 mL y se incubaron a 30 °C y 300 rpm hasta una D. O. de 2-3. Se cosecharon las células mediante centrifugación a 3500 rpm durante 5 min y el pellet se resuspendió en medio BMMY hasta una D.O. de 1 para inducir la expresión. El cultivo se colocó en un matraz de 1 L utilizando capas de gasa como tapón y se volvió a incubar bajo las mismas condiciones.

Para mantener la inducción se añadió metanol 100% a una concentración final de 0.5% cada 12 h.

Se tomó 1 mL del cultivo a las 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 horas y se centrifugó para obtener el sobrenadante. A este se le midió actividad cualitativamente con a-NA para monitorear la expresión de la cutinasa. Los sobrenadantes que presentaron mayor actividad se precipitaron con TCA para ser cargados en geles SDS-PAGE y en zimogramas y además se les determinó actividad cuantitativa frente a p-NPA y proteína mediante la técnica de Bradford. Se inoculó otro matraz con la cepa de *P. pastoris* X-33 sin transformar y se trató de la misma manera que la empleada con las clonas positivas para ser utilizada como control negativo.

6. Resultados y Discusión

Producción de la cutinasa de 29 kDa en el medio optimizado.

Se cultivó *A. nidulans* en el medio optimizado para la producción de la cutinasa de 29 kDa, descrito en Materiales y Métodos. Luego de 24 h el cultivo se filtró y al extracto crudo del medio se le determinó la actividad cualitativamente, utilizando α -Naftil acetato como sustrato.

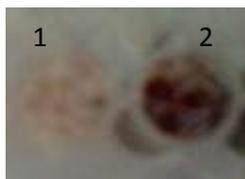


Figura 6.1: Medición de actividad cualitativa de extractos crudos. 1 Blanco buffer fosfatos 50 mM pH 7, 2: Extracto crudo del medio optimizado para la cutinasa de 29 kDa después de 24 h de incubación.

En la figura 6.1 se puede observar que el extracto crudo presentó una buena actividad, lo que se demostró por el desarrollo de una coloración rojiza al añadir los reactivos y que contrasta con la poca coloración que se obtuvo para el blanco. Esto coincide con lo reportado previamente por Castro-Ochoa donde la actividad de la cutinasa de 29 kDa se encuentra a las 24 horas de fermentación (Castro-Ochoa et al., 2012).

Una vez verificada la actividad del extracto, se corrieron geles de electroforesis SDS-PAGE al 14% y se realizaron zimogramas para determinar la masa molecular de las enzimas responsables de la actividad (figura 6.2).

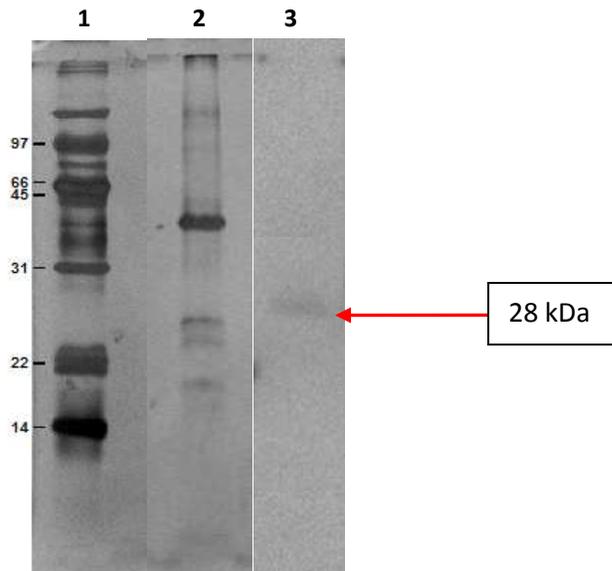


Figura 6.2: Perfil de proteínas de los extractos crudos del medio optimizado para la producción de la cutinasa de 29 kDa y determinación cualitativa de actividad. Gel SDS PAGE 14%, tinción de plata. Carril 1: MPM low Range BioRad, Carril 2: Medio optimizado Cut29. Carril 3: Zimograma medio optimizado Cut29. El perfil electroforético mostrado en la figura 6.2 permite identificar bandas en la zona correspondiente a la masa molecular esperada, y en el zimograma revelado con acetato de α -naftilo se comprueba que únicamente hay una banda, alrededor de 29 kDa, que es responsable de la actividad de esterasa.

Concentración de la proteína y cuantificación de la actividad

Se midió la concentración de proteína mediante la técnica de Bradford y se cuantificó la actividad espectrofotométricamente con *p*-NPL para calcular la actividad específica (gráfico 6.3) y ver cuál de los métodos utilizados para la concentración del extracto crudo resultó más eficiente.

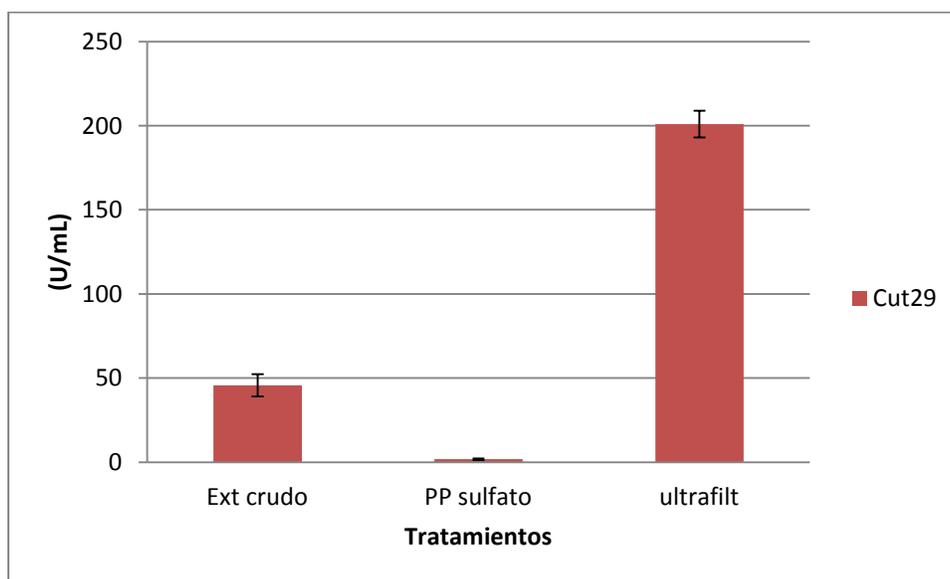


Gráfico 6.1: Actividad enzimática volumétrica del extracto crudo medio para la producción de la cutinasa de 29 kDa y de los diferentes métodos de concentración usados para la cutinasa de 29 kDa. Se tomaron 10 μ L de cada condición y se incubaron en buffer de fosfatos 50 mM pH 7 con 20 μ L del *p*-NPL para un volumen de reacción final de 200 μ L. Según lo reportado en Materiales y Métodos. Las barras de error corresponden a la DS de tres mediciones independientes.

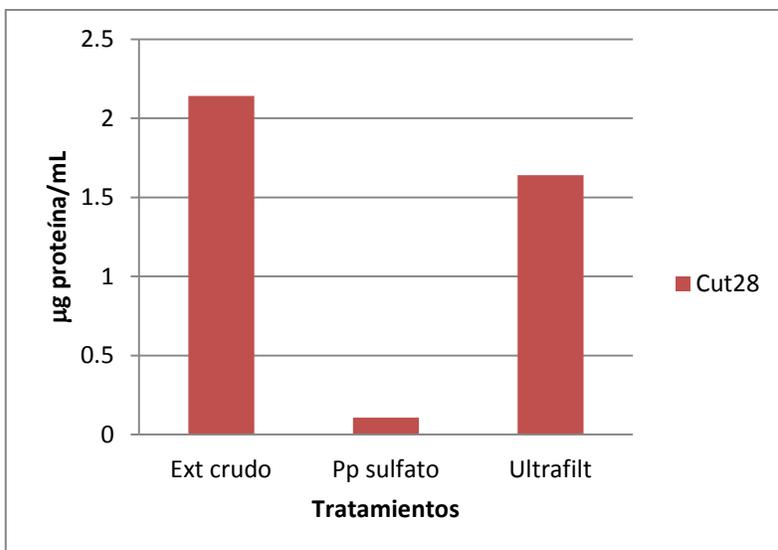


Gráfico 6.2: Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford del extracto crudo medio para la producción de la cutinasa de 29 kDa y de los diferentes métodos de concentración usados para la cutinasa de 29 kDa. Se tomaron 160 µL de una dilución 1:10 de cada condición y se añadieron 40 µL del reactivo de Bradford de BioRad para un volumen de reacción final de 200 µL según lo reportado en Materiales y Métodos.

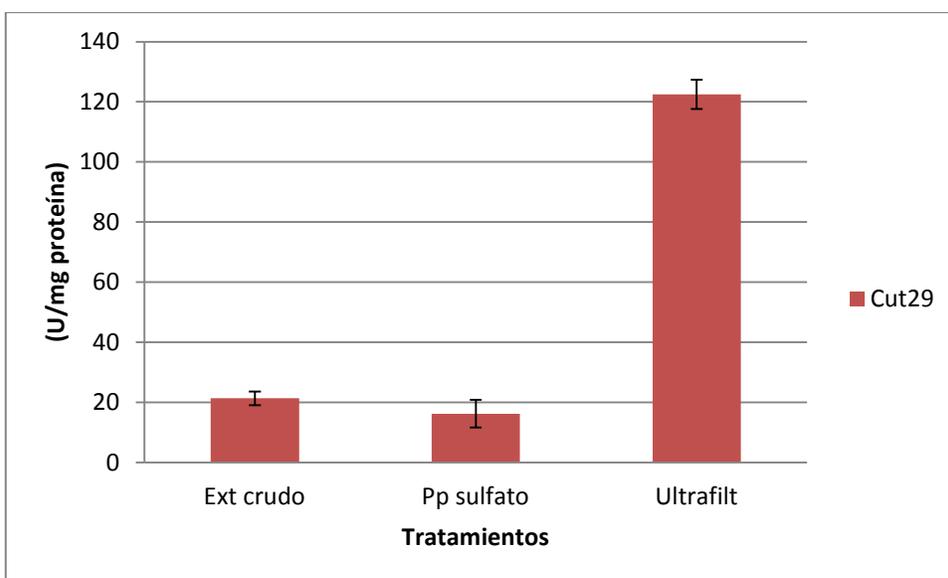


Gráfico 6.3: Actividad específica del extracto crudo del medio para la producción de la cutinasa de 29 kDa y de los diferentes métodos de concentración usados para la cutinasa de 29 kDa: precipitación con sulfato de amonio y ultrafiltración. Las barras de error corresponden a la DS de tres mediciones independientes.

Tabla 6.1: Comparación de la actividad específica (U/mg proteína) de los distintos métodos de purificación empleados para la cutinasa de 29 kDa

Proteína	Ext. Crudo	Pp al 65%	Ultrafiltración
Cutinasa 29	21.32	16.2	122.46

Además se corrieron geles desnaturalizantes y zimogramas para verificar cuál de los métodos utilizados para la concentración del extracto crudo resultaba en una menor pérdida de actividad (figura 6.3).

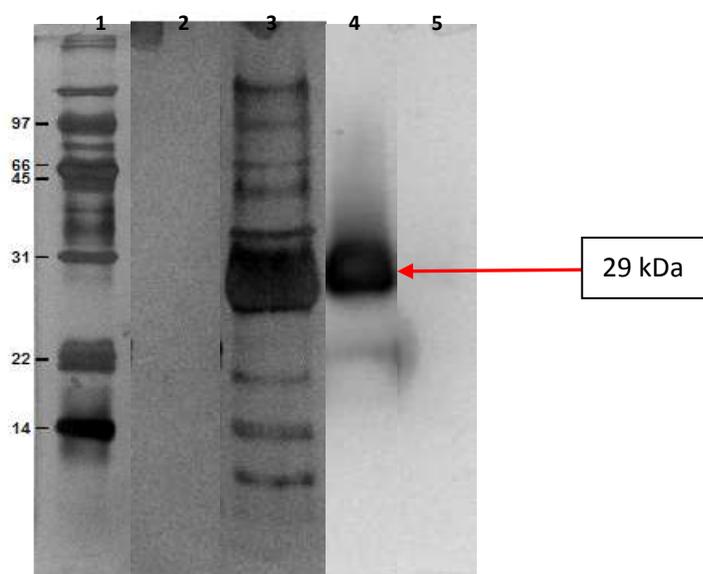


Figura 6.3: Perfil de proteínas (SDS-PAGE) y zimograma para las fracciones concentradas. Carril 1: MPM Low Range de Biorad, Carril 2: Dializado medio cut28, Carril 3: Ultrafiltrado medio cut28, Carril 4: zimograma ultrafiltrado medio cut28, Carril 5: zimograma dializado medio cut28

Al observar la tabla 6.1 y los zimogramas puede verse que después de la diálisis la concentración de proteína es muy baja, por lo que probablemente se debió ensayar otras concentraciones mayores de sulfato de amonio. La actividad de la cutinasa de 29 kDa disminuyó notablemente después de la diálisis, lo que podría deberse a la pérdida de algún cofactor durante el tratamiento, lo que conduce a que la actividad específica del dializado disminuya en comparación con la del extracto crudo. Por otro lado con la ultrafiltración se consiguió un aumento considerable en la actividad específica ya que disminuye considerablemente la concentración de proteína y en el zimograma se observa una banda de actividad muy intensa a los 29 kDa y otra más por debajo que se ha reportado previamente como un producto de degradación de la misma enzima (Castro-

Ochoa et al., 2012) Por tanto se decidió utilizar la ultrafiltración como método para concentrar el extracto crudo antes de purificarlo.

Purificación mediante cromatografía en gel de poliacrilamida

Para purificar las cutinasas se utilizó el sistema Mini PrepCell de BioRad que es una electroforesis de elusión continua en gel de poliacrilamida. El gel está conectado a una bomba peristáltica y a un colector de fracciones. La concentración del gel de acrilamida fue de 14% y se utilizó un flujo de 0.1mL/minuto colectando fracciones cada 2.5 min.

Para cargar, la muestra se precipitó con TCA y se resuspendió en buffer de carga con β -mercaptoetanol y SDS y se calentó 5 min a 95°C antes de cargarse dentro de la columna del gel. Se corrió el gel desnaturalizante a 1 Watt constante y se colectaron 80 fracciones de 250 μ L cada una.

Determinación de actividad en las fracciones colectadas

Ya que la separación de las proteínas se llevó a cabo en un ambiente desnaturalizante, para medir actividad cualitativa fue necesario renaturalizar las fracciones. Para esto se utilizó un buffer de fosfatos 50 mM pH 7 con Tritón 100-X al 0.5%. Se incubaron las fracciones en este buffer durante 24 horas y posteriormente se determinó actividad utilizando α -Naftil Acetato.

Para la cutinasa de 29 kDa las fracciones 58 a la 64 presentaron actividad, según se observa en la figura 6.4:

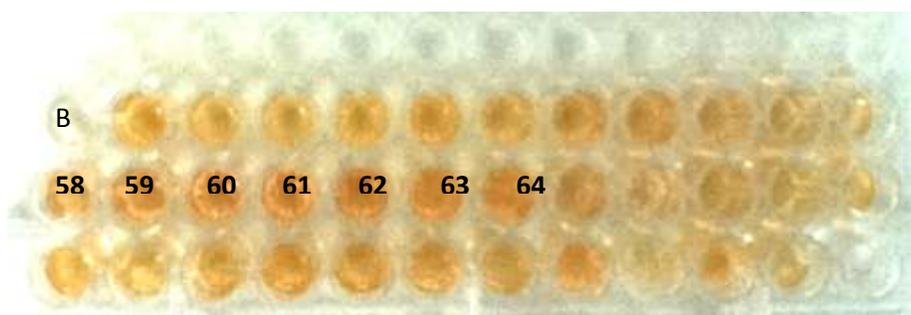


Figura 6.4: Medición cualitativa de actividad de las fracciones colectadas de la Cut 29 (ANCUT2) utilizando α -Naftil acetato. Cada pozo corresponde a una diferente fracción colectada después de la corrida de PrepCell. Aquellos pozos marcados con su número correspondiente son los que presentaron actividad y el blanco se identifica con la letra B.

Para corroborar que en las fracciones colectadas la enzima se encontraba pura, se cargaron algunas de estas en geles SDS-PAGE; éstos fueron teñidos con plata y analizados

en un documentador de geles (Gel Doc) de BioRad, donde se corroboró además de la pureza, el peso esperado para las bandas de 29 kDa.

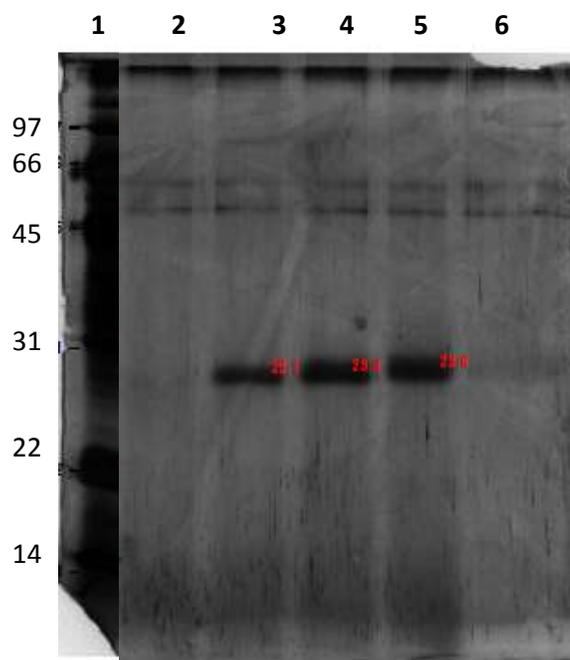


Figura 6.5: Gel SDS-PAGE para las fracciones con actividad de la cutinasa de 29 kDa. Carril 1: MPM low range de BioRad. Carril 2: fracción 58 (sin actividad). Carril 3: fracción 59, Carril 4: fracción 62, Carril 5: fracción 64. Carril 6: fracción 69

Una vez corroborada la pureza, se juntaron las fracciones con actividad y se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford, así como la actividad de hidrólisis con *p*-NPA en microplaca en el espectrofotómetro Epoch (Biotek). Estos datos se muestran, junto con un resumen de los pasos de purificación en la tabla 6.2.

Tabla 6.2: Resumen del procedimiento de purificación de la cutinasa de 29 kDa de *A. nidulans*

Operación	Vol inicial (mL)	Vol final (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Actividad (U/mL)	Actividad Esp (U/mgP)	Actividad total (U)	Rendimiento (%)	Factor Purificación (veces)
Extracto Crudo	250	250	2.14	535	45.64	21.32	11410	100	1
Ultrafiltración	250	1.5	1.64	2.46	200.84	122.463	301.26	2.640	5.744
PrepCell	0.5	1.5	0.0771	0.11565	400	5188.067	600	5.259	243.343

Por tanto, se puede decir que la electroforesis de elusión continua en gel de acrilamida nos permite obtener a la cutinasa de 29 kDa pura. Presenta como inconvenientes el que

al ser corrida en condiciones desnaturalizantes, se deben renaturalizar las fracciones y se pierde actividad.

Caracterización de la cutinasa de 29 kDa (ANCUT2)

Efecto de la temperatura sobre la actividad de la cutinasa de 29 kDa

Como se reportó en el apartado de Materiales y Métodos, se midió la actividad frente a p-NPA en un rango de temperatura de 30 a 70°C para observar el efecto de la temperatura sobre de la enzima. Como se observa en el gráfico 6.4, la temperatura óptima del ensayo para la actividad de cutinasa fue 60°C; sin embargo a 70°C todavía tiene una actividad residual aceptable del 80%, lo que se observa en la gráfica 6.5 donde se muestran las actividades residuales en porcentaje obtenidas luego de tres tiempos distintos de incubación.

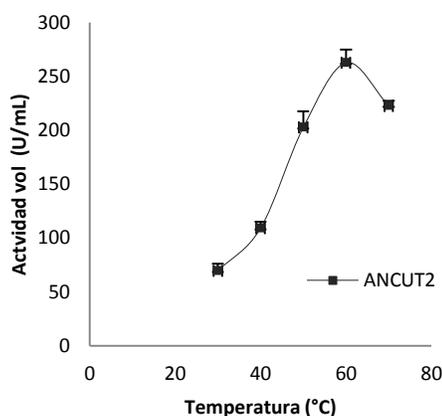


Gráfico 6.4: Efecto de la temperatura sobre la cutinasa de 29 kDa En la gráfica se representan los valores de actividad volumétrica para cada temperatura ensayada. Todas las mediciones se hicieron utilizando 0.771µg de enzima y 10 µl de sustrato 1 mM en un volumen final de 200 µL. Las barras de error corresponden a la DS de tres mediciones independientes.

Como se sabe, al aumentar la temperatura, existe un aumento en la energía cinética de las partículas, lo que genera un mayor número de choques entre ellas, disminuyendo así la energía de activación necesaria para llevar a cabo la reacción. En las reacciones catalizadas enzimáticamente el efecto positivo de la temperatura está contrastado por el efecto de la desnaturalización térmica. La actividad catalítica de la enzima se debe a una estructura terciaria altamente compleja y ordenada dada por fuerzas no covalentes principalmente, por lo que ante un aumento en la entalpía, la estructura terciaria se rompe y la enzima se desnaturaliza, perdiendo así su actividad catalítica (Segel, 1982). Esto explica que la

actividad de la enzima alcance un máximo en la temperatura idónea y a partir de este comience a disminuir al seguir aumentando la temperatura.

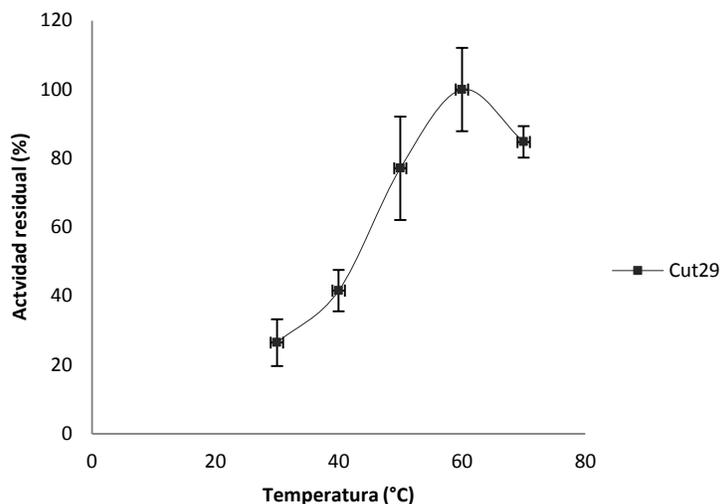


Gráfico 6.5: Actividad residual de la cutinasa de 29 kDa después de incubar a las diferentes temperaturas. Las barras de error corresponden a la DS de tres mediciones independientes.

Con los datos obtenidos del efecto de la temperatura sobre la enzima, fue posible calcular la energía de activación (E_a) necesaria para que la cutinasa lleve a cabo la hidrólisis de *p*-NPA.

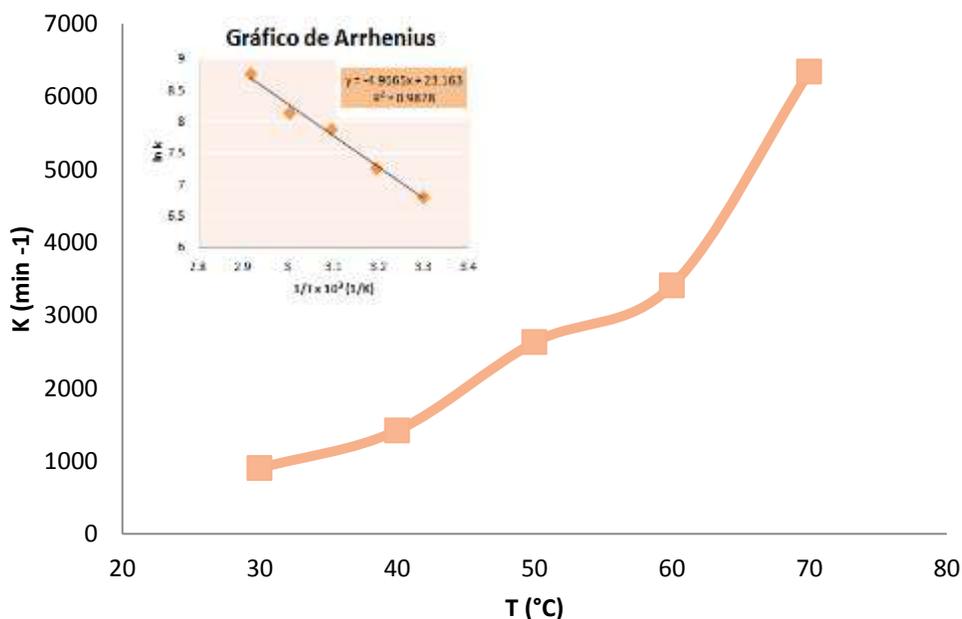


Gráfico 6.6: Gráfica de Arrhenius para la hidrólisis de *p*-NPA por la cutinasa de 29 kDa.

A partir de la gráfica 6.6 se calculó que para la hidrólisis de *p*-NPA la E_a de la cutinasa de 29 kDa fue de 23.617 kcal/mol (98.539 J/mol); valor que se encuentra dentro del rango reportado para otras enzimas termoestables como la PrtA de *Aspergillus nidulans* ($E_a=65.9$ kcal/mol), la pectin liasa de *Thermophilic bacillus sp* ($E_a=35$ kcal/mol), y la β -glucosil hidrolasa de *Pirococcus furiosus* ($E_a=17.22$ kcal/mol); aun cuando estas dos últimas enzimas provienen de organismos termofílicos (Peña- Montes, et al 2008; Takao et al., 2000; Thomsen et al., 2008). Este resultado confirma lo propuesto por Castro-Ochoa sobre la termoestabilidad conferida por la presencia de 6 cisteínas que forman 3 puentes disulfuro (Castro-Ochoa, 2012) y que le aporta más estabilidad que a otras cutinasas reportadas como la Cut1 de *F. solani* f. sp. *pisi*, la cual sólo presenta 2 puentes disulfuro y necesita de agentes estabilizantes como la trealosa para alcanzar valores de E_a más bajos (Baptista, 2000; Melo et al., 2003; Crevel et al., 2001).

Efecto del pH sobre la actividad de la cutinasa de 29 kDa

Para evaluar el efecto del pH sobre la actividad de la enzima, se utilizaron buffers en un rango de pH de 5 a 11. Se evaluó la actividad espectrofotométricamente y se observó que el pH óptimo fue de 9, ya que es donde se encontró la mayor actividad (gráfico 6.7), sin embargo a pH 10 todavía se mantiene una buena actividad residual como puede observarse en el gráfico 5. Estos datos son consistentes con otros estudios previos en donde se ha visto que muchas cutinasas de origen fúngico y bacteriano presentan su actividad máxima a pH alcalino (Maeda et al., 2005; Liu et al., 2009; Speranza et al., 2011)

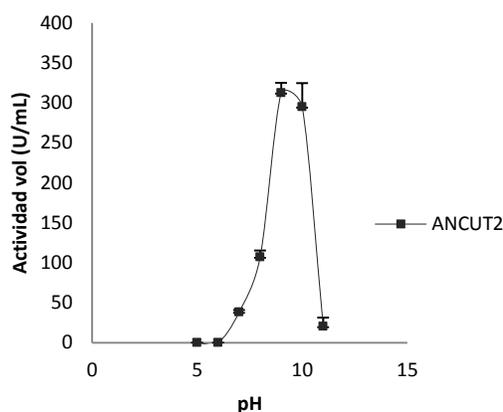


Gráfico 6.7: Efecto del pH en la actividad de la cutinasa de 29 kDa. En el gráfico se observa la actividad volumétrica para pH ensayado. Todas las mediciones se hicieron utilizando 0.771 μ g de enzima y 10 μ l de sustrato 1 mM en un volumen final de 200 μ l. Las barras de error corresponden a la DS de tres mediciones independientes.

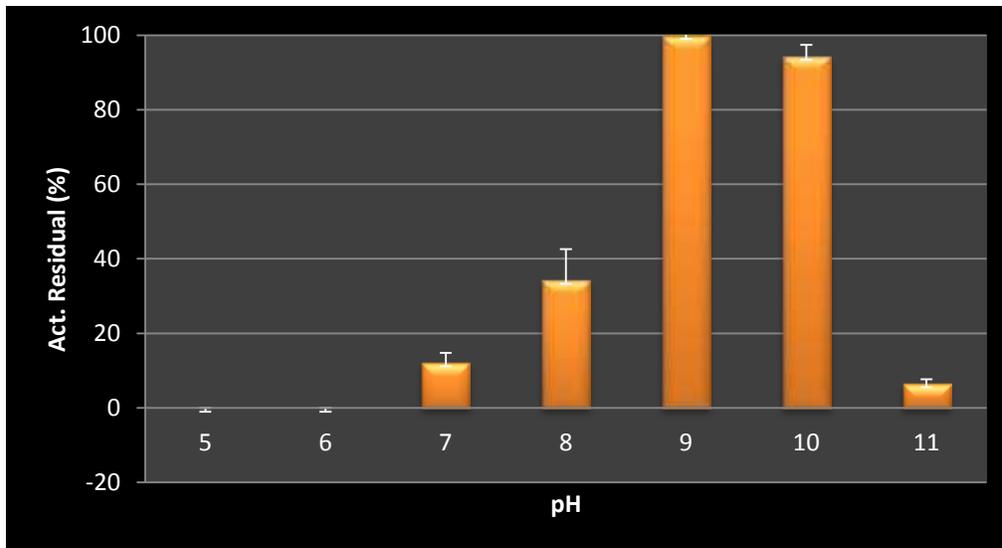


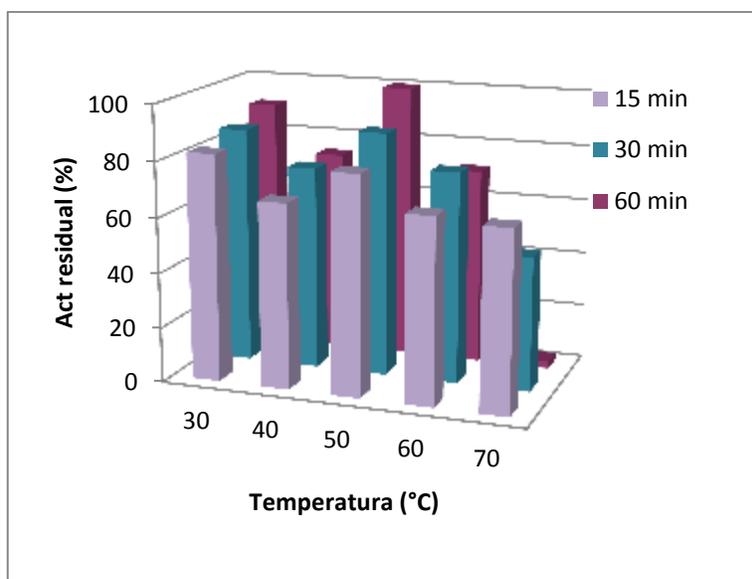
Gráfico 6.8: Actividad residual de la cutinasa de 29 kDa frente al pH. Las barras de error corresponden a la DS de tres mediciones independientes.

Observando los gráficos **6.7 y 6.8** podemos ver que la cutinasa mostro mayor actividad a pHs básicos y que esta es muy baja a valores de pH menores o iguales a 7; esto puede deberse a que, como lo señalan estudios hechos en la cutinasa 1 de *Fusarium solani* f. sp. *psidi*, a valores bajos de pH hay un exceso de cargas positivas en la superficie de la enzima lo que no permite la desprotonación de los aminoácidos que forman la triada catalítica (Ser, His, Asp o Glu). Esta desprotonación es necesaria para la interacción entre los aminoácidos de la triada y otros que la rodean y que son necesarios para que se lleve a cabo la catálisis. Por otro lado, a valores de pH básicos entre 8.5 y 9, el sitio activo tiene una carga ligeramente negativa, pues los residuos de Asp y Glu de la triada están desprotonados, mientras que la Tyr permanece protonada y la His está neutra (muy cercana a su pI). Esto permite formar la red de puentes de hidrógeno que estabiliza la cavidad oxianiónica de la enzima. Sin embargo a valores muy altos de pH por arriba de 10, habrá entonces un exceso de carga negativa por la desprotonación del grupo fenol de la Tyr, lo que impide que este aminoácido forme parte de las redes de puentes de hidrógeno y genera una desestabilización de la estructura tridimensional de la cutinasa, lo que se traduce en una drástica disminución de la actividad enzimática (Petersen et al., 2001).

Estabilidad frente a la temperatura y al pH

Para probar la estabilidad de la enzima en el tiempo frente a la temperatura y al pH se incubó la misma a diferentes intervalos de tiempo en un rango de temperaturas de 30 a 70 y en el caso del pH bajo un rango de 5 a 11.

En el gráfico 6.9 se observa que la cutinasa de 29 kDa presenta una buena estabilidad térmica ya que mantiene actividades residuales mayores al 80% a todas las temperaturas y en los 3 tiempo de incubación, excepto a 70°C, donde a partir de los 30 min la actividad disminuye por abajo del 50% y después de 1 h pierde el 97% de su actividad. Resultados similares se han observado para la cutinasa de *A. oryzae* (pierde el 92% de actividad después de incubarse por 1 h a 60°C) que también presenta 3 puentes disulfuro y que comparte un 88.7% de identidad con la cutinasa de 29 kDa de *A. nidulans* (Maeda et al., 2005). En temperaturas de 30 a 50°C prácticamente la actividad no se ve afectada por el tiempo de incubación e incluso a 50°C se ve una mayor actividad a 1 h que a 30 min, con lo que se ve que la “memoria” de la enzima la estabiliza luego de un tiempo mayor de incubación a esa temperatura. Al contrario de lo que sucede para muchas cutinasas bacterianas que presentan temperaturas óptimas elevadas, de entre 80 y 90 °C (Carvalho et al., 1998; Dutta et al., 2009); Esta estabilidad a altas temperaturas y tiempos largos de incubación contrasta con lo reportado para las cutinasas de origen fúngico; las cuales por lo regular presentan una temperatura óptima de 37°C y exhiben una baja resistencia a temperaturas mayores (Speranza et al., 2011); únicamente la cutinasa de *Thermobifida fusca* ha sido reportada previamente como termoestable (Chen et al., 2010).



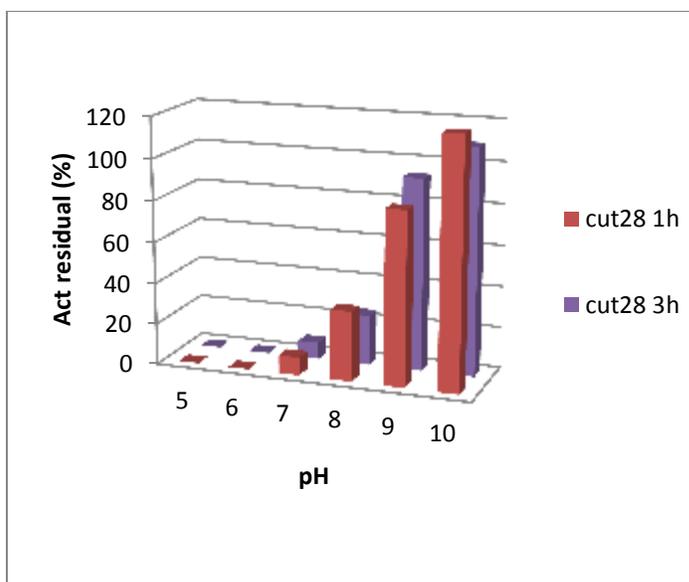
T (°C)	DS 15 min	DS 30 min	DS 60 min
30	12.3	5.8	6.34
40	5.67	7.45	2.38
50	5.36	3.42	5.4
60	6.53	3.45	4.52
70	12.89	15.76	6.73

Gráfico 6.9: Estabilidad térmica frente al tiempo de la cutinasa de 29 kDa después de incubar a las diferentes temperaturas durante 15 (barras lila), 30 (barras azules) y 60 (barras moradas) minutos. En la tabla anexa se encuentran las DS resultado de tres mediciones independientes para cada condición.

Para medir la estabilidad en el tiempo frente a los diferentes pH, se incubó la enzima por 1 y 3 horas y como se observa en el gráfico 6.10, no hay una diferencia marcada entre

ambos tiempos. Además puede verse que incluso a pH 10 la enzima conserva su actividad por arriba del 95% mientras que a pH 7 y 8 la actividad incluso a 1 hora de incubación disminuye por debajo del 50%. Nuevamente se ve que a valores de pH menores a 7 la enzima no tiene actividad, con lo que se confirma que la actividad se ve favorecida a pH alcalino.

Los resultados de estabilidad frente a temperatura y pH demuestran que la cutinasa de 29 kDa es una enzima termo-alcalina, lo cual le permitiría ser usada en procesos industriales y biotecnológicos en los que se requieran condiciones extremas de reacción; otra ventaja de su uso es que permiten elevar la temperatura de los procesos lo que facilita la solubilidad de muchos compuestos orgánicos y disminuye el riesgo de tener contaminaciones biológicas (Niehaus et al., 1999). En el caso particular de las carboxilesterasas, que se han reportado como enantioselectivas también pueden ser usadas para la síntesis de nuevos materiales biopoliméricos; para la obtención de biodiesel a partir de desechos industriales y para la producción de químicos finos (Bouzas et al., 2006; Badenes et al., 2010; Lias et al., 2012).



pH	DS 1 h	DS 3 h
5	0	0
6	0	0
7	5.36	3.14
8	4.99	7.4
9	23.43	21.81
10	62.48	15.9

Gráfico 6.10: Estabilidad frente al tiempo y al pH de la cutinasa de 29 kDa después de ser incubada en los diferentes buffers durante 1 h (barras rojas) y 3 h (barras moradas). En la tabla anexa se encuentran los DS resultado de tres mediciones independientes para cada condición.

Determinación de la especificidad por sustrato

Se probaron diferentes *p*-NP ésteres, cubriendo un largo de cadena de 2 a 18, para observar la preferencia de hidrólisis de la enzima. Como se ve en el gráfico **6.11**, la

cutinasa de 29 kDa presenta una mayor afinidad por ésteres de cadena corta (2 y 4 carbonos) pero también tiene una actividad aceptable frente a ésteres de cadena larga (a partir de 14 carbonos); sin embargo por los de cadena intermedia presenta una baja actividad. Este comportamiento

Está reportado que las cutinasas no tienen un patrón claro de preferencia a sustratos, ya que pueden hidrolizar ésteres de cadena corta y de cadena larga. Sin embargo existen referencias que indican que frente a cadenas intermedias la actividad decrece y se han reportado cutinasas que tienen una mayor actividad frente a ésteres de cadenas cortas (Sebastian y Kolattukudy, 1988; Kodama et al., 2009), o con un comportamiento intermedio entre esterasas y lipasas (Speranza et al., 2011; Kademi et al., 1999; Liu et al., 2009). La capacidad de hidrolizar ésteres de cadena larga, de 16 y 18 carbonos, se explica recordando que su sustrato natural, la cutina presenta en su composición mayoritariamente ésteres de ese tamaño de cadena; sin embargo el hecho de que presente una mayor preferencia sobre ésteres de cadena corta habla de la amplia capacidad hidrolítica de este tipo de enzimas.

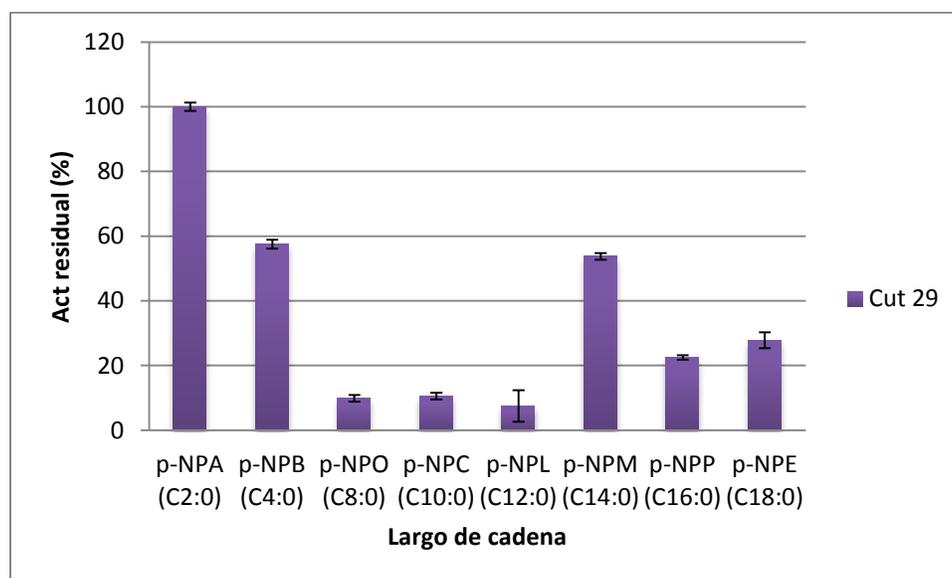


Gráfico 6.11: Especificidad frente a largo de cadena de la cutinasa de 29 kDa. Se muestran las actividades residuales obtenidas utilizando como sustratos *p*-NP ésteres de diferente largo de cadena. La actividad del 100% fue la presentada frente a *p*-NPA a temperatura ambiente y en buffer Tris-HCl pH 9 ya que fue el valor más alto obtenido. Las barras de error corresponden a la DS de tres mediciones independientes.

Efecto de iones en la actividad de la cutinasa de 29 kDa

Como se sabe, algunas enzimas necesitan de iones metálicos, generalmente llamados cofactores, para que su actividad enzimática sea óptima. Ya que durante los procesos de

concentración y purificación pueden perderse algunos de estos cofactores, se realizó un ensayo en el que se añadieron iones mono, di y trivalentes a una solución de enzima pura. Se midió su actividad y se comparó con la actividad de una muestra control. Los resultados de la actividad residual se muestran en el gráfico 6.12.

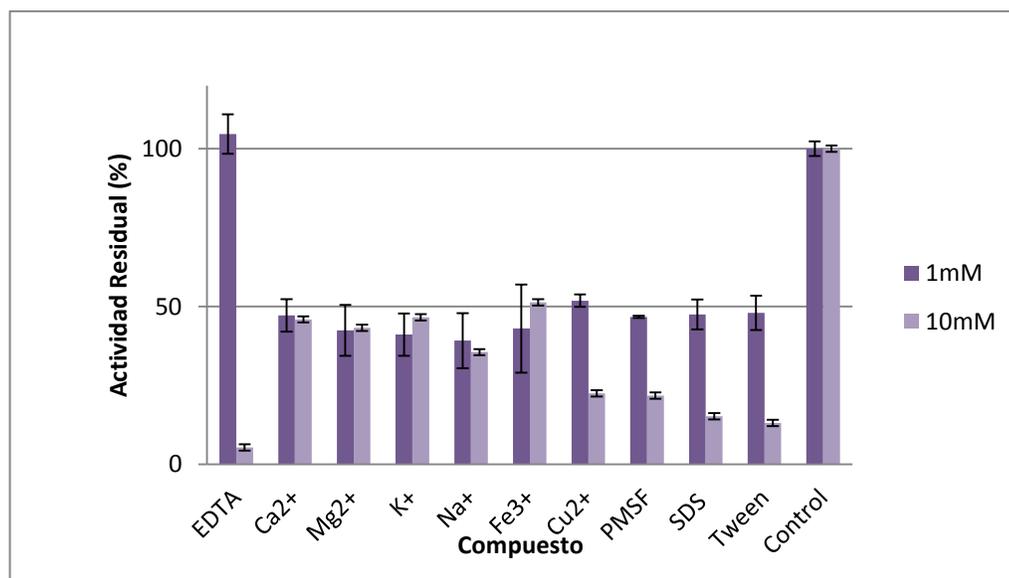


Gráfico 6.12 Efecto de diferentes iones metálicos, surfactantes y posibles inhibidores en la actividad enzimática de la cutinasa de 29 kDa. Se grafica la actividad residual tomando como 100% la actividad frente a *p*-NPA a temperatura ambiente y en buffer Tris-HCl pH 9 sin la adición de ningún compuesto. Las barras de error corresponden a la DS de tres mediciones independientes.

Como se observa en el gráfico, los iones añadidos parecen no tener un efecto favorable para la actividad enzimática de la cutinasa de 29 kDa; inclusive, muchos de ellos inactivaron parcialmente a la enzima bajo las dos concentraciones ensayadas. Los iones que más afectan a la actividad frente a *p*-NPA son el Na⁺ y el Cu²⁺. Existen reportes en los que otras cutinasas presentan un comportamiento similar; ya que no se observa ningún incremento en la actividad al añadir iones divalentes o monovalentes y por el contrario algunos como el Fe²⁺ inactivan totalmente a la enzima (Chen et al., 2010; Stöcklein et al 1993). Este efecto negativo de la adición de iones puede deberse a cambios en la fuerza iónica en el medio; estos cambios generados por un incremento en la concentraciones de sales ocasiona que estas sales compitan con la proteína por las moléculas de agua y disminuyan la capa de solvatación que existe alrededor de ella; esto aumenta las interacciones proteína-proteína y genera la agregación o desnaturalización proteica.

Efecto de posibles inhibidores sobre la actividad enzimática

Para probar el efecto presumiblemente negativo que pudieran tener distintos surfactantes sobre la actividad enzimática de la cutinasa de 29 kDa, se realizó un ensayo similar al anterior en el que se incubó una solución de enzima pura con dos concentraciones diferentes de surfactantes. Los resultados pueden verse igualmente en el gráfico **6.12**; donde observamos que los surfactantes utilizados inhiben casi completamente la actividad enzimática; mientras que el agente quelante EDTA a una concentración de 1 mM mantiene la actividad en un 100%. Una posible explicación a este fenómeno se debe al efecto que tienen los surfactantes sobre la tensión superficial del medio. En el caso de los detergentes aniónicos como el SDS afectan las interacciones hidrofóbicas de la proteína exponiendo los grupos hidrofóbicos y generando la desnaturalización de la enzima.

Adicionalmente se realizó un ensayo utilizando un inhibidor de serin proteasas, el PMSF que al interactuar directamente con la serina de la triada catalítica inhibe la actividad en muchas enzimas como proteasas o lipasas; sin embargo como se puede observar en el gráfico **6.12** la cutinasa de 29 kDa no pierde totalmente la actividad en presencia de este reactivo; existen reportes que indican que otras cutinasas tampoco se inhiben totalmente en presencia de PMSF (Stöcklein et al., 1993; Ohnishi et al., 1994).

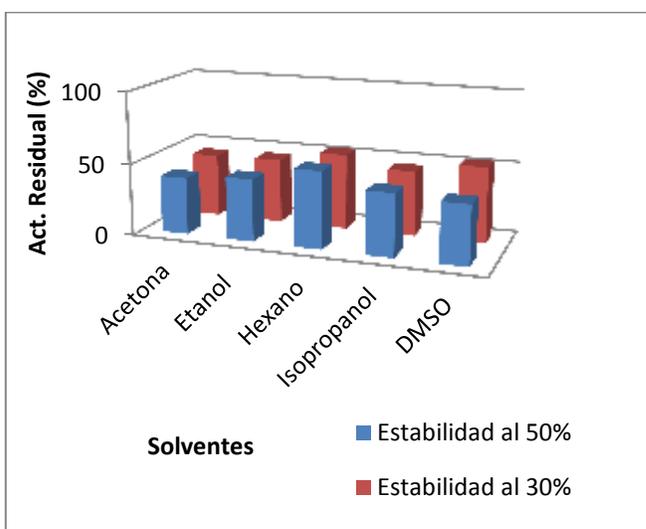
Efecto de diferentes solventes sobre la actividad enzimática

Muchas de las posibles aplicaciones biocatalíticas de las carboxilesterasas se llevan a cabo en medios no acuosos; por lo tanto es importante caracterizar la estabilidad de la cutinasa frente a solventes a varias concentraciones. El interés de que las cutinasas presenten una buena estabilidad frente a solventes orgánicos radica en que en condiciones de baja actividad acuosa, el equilibrio termodinámico de la reacción de biocatálisis favorece la síntesis sobre la hidrólisis y de esta forma es posible obtener muchos de los compuestos de interés; además utilizando estos medios se aumenta la solubilidad de muchos sustratos y productos y se disminuye una posible contaminación microbiana (Niehaus et al., 1999).

Se utilizaron dos concentraciones diferentes de solventes y los resultados de la actividad residual de la cutinasa están plasmados en el gráfico **6.13**. En este se observa que la mayor estabilidad se obtiene en hexano (donde conserva una actividad residual de casi 60%) aunque también presenta cierta estabilidad frente a los otros solventes donde la actividad se conserva hasta en un 40%. Con lo anterior podemos decir que la enzima es estable frente a solventes que presentan una polaridad y un índice de hidrofobicidad muy variado. Si representamos la hidrofobicidad como el logaritmo del coeficiente de partición (LogP) podemos fijar un rango de estabilidad para la cutinasa de 29 kDa que va de -1.12 (dado por el etanol) hasta 3.2 (dado por el hexano). Además cabe destacar que mediante el

cálculo de la t de Student no se observaron diferencias significativas entre las dos concentraciones de solvente ensayadas con un 95% de nivel de confianza con excepción del DMSO que sí las presentó (**Anexo F**).

Esta amplia gama de estabilidad frente a solventes se ha reportado previamente para otras lipasas fúngicas (como las de *Fusarium heterosporum*) en las que la proporción de residuos cargados positivamente es similar a la proporción de residuos con carga negativa (50/50); y en las que la principal característica que aporta la estabilidad en medio orgánico es la presencia de varios puentes disulfuro (Nagao et al., 2002; Chakravorty et al., 2011). Dado que la cutinasa de 29 kDa presenta 3 enlaces disulfuro es posible compararla con las otras estudiadas previamente (en *F. heterosporum*) y así atribuirle su estabilidad en solventes orgánicos más a los puentes disulfuro que a la carga superficial que presenta.



Solvente	DS 30%	DS 50%
Acetona	4.997	0.358
Etanol	3.902	1.036
Hexano	1.770	2.569
Isopropanol	3.913	3.881
DMSO	4.168	1.649

Gráfico 6.13 Estabilidad de la cutinasa de 29 kDa frente a dos concentraciones 30% (barras rojas) y 50% (barras azules) de solventes orgánicos. La actividad contra p-NPA se midió después de incubar a la enzima en buffer Tris-HCL y el solvente correspondiente durante 24 h y se tomó como el 100% de actividad un control sin solvente añadido. En la tabla anexa se encuentran las DS resultado de tres mediciones independientes para cada condición.

Cálculo de parámetros cinéticos

Para calcular los parámetros cinéticos K_m , k_{cat} y la eficiencia catalítica se midió la actividad frente a diferentes concentraciones de p-NPA ya que fue el sustrato por el que la enzima presenta una mayor actividad. Los datos obtenidos se ajustaron a la ecuación de

Michaelis-Menten mediante el modelo de linearización de Lineweaver-Burke para calcular k_m y V_{max} como se muestra en el gráfico **6.14**:

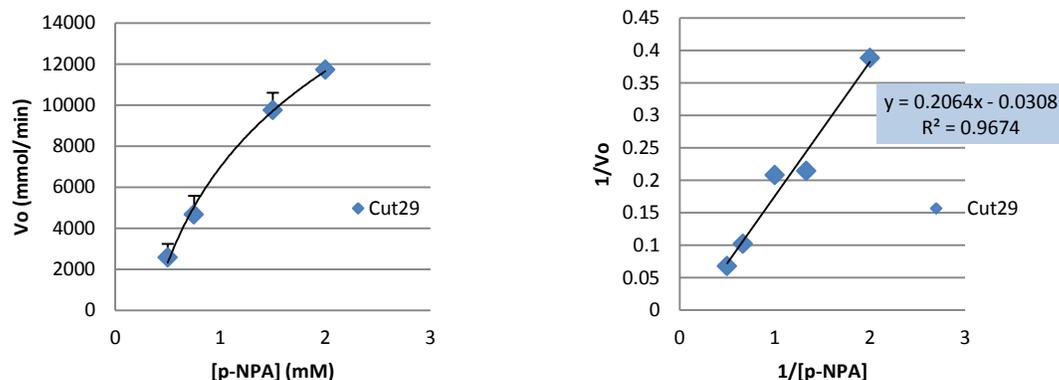


Gráfico 6.14: Gráfico de Michaelis-Menten y su representación de Lineweaver- Burke para el cálculo de los parámetros cinéticos de la cutinasa de 29 kDa utilizando como sustrato *p*-NPA.

A partir del gráfico **6.14** se calcularon los parámetros cinéticos que se muestran en la tabla 6.3.

Tabla 6.3: Parámetros cinéticos de la cutinasa de 29 kDa

Vmax (mM/min)	Km (mM)	Kcat (min ⁻¹)	kcat/km (mM ⁻¹ min ⁻¹)	Ciclo catalítico
33.33	6.88	242.11	35.19	0.25

No existen muchos reportes sobre parámetros cinéticos de otras cutinasas, sin embargo para otras carboxilesterasas sí los hay. En estos estudios se ve que los valores obtenidos para la cutinasa de 29 kDa se encuentran dentro del rango de los valores reportados para la hidrólisis de *p*-NPésteres de diferentes lipasas y esterasas, como se puede ver en la tabla **6.4** por lo que la cutinasa puede competir con otras enzimas ya caracterizadas en esta reacción

Tabla 6.4: Parámetros cinéticos de diferentes lipasas y esterasas

Enzima	Vmax (μM/min)	Km (mM)	kcat (s ⁻¹)	kcat/Km (x10 ³ mM s ⁻¹)	Referencia
<i>Litopenaeus vannamei</i> Lip PVL	3042±2.88	0.24±00	12670±0.27	52.8±2.33	Rivera-Pérez et al., 2010
<i>Litopenaeus vannamei</i> Lip PVL_IL	1226±1.23	41.03±0.02	200.24±0.87	4.88±1.1	Rivera-Pérez et al., 2011
<i>Paenibacillus sp.</i> BP-23	ND	0.0155	ND	ND	Prim et al., 2003
<i>Bacillus sp.</i> BP-7	ND	0.026	ND	ND	Prim et al.,

EstA1					2003
<i>Bacillus subtilis</i> LipA	ND	0.031	ND	ND	Prim et al., 2003
<i>Bacillus circulans</i> MAS2	4300	0.24	ND	ND	Kademi et al., 1999

Determinación de sitios de glicosilación

No se detectaron sitios de glicosilación en la proteína de 29 kDa ya que no hubo reacción positiva con ninguna de las aglutininas probadas (Datos no mostrados). Esto contrasta con lo reportado para otras cutinasas fúngicas que se encuentran glicosiladas con residuos de ácido glucurónico o manosa (Flurkey & Kolattukudy, 1981; Soliday & Kolattukudy, 1979).

Ensayo de actividad cutinolítica

Por otro lado se comprobó que la cutinasa de 29 kDa es capaz de llevar a cabo la hidrólisis de cutina, liberando ácidos grasos de cadena larga de la molécula tridimensional de cutina. Para esto, se realizó un ensayo en tolueno (que fue el solvente que logró solubilizar a la cutina), a pH óptimo de 9 y a 37°C durante 72h según las condiciones optimizadas reportadas previamente por Castro Ochoa en 2012 en las que también probó que la cutinasa sigue activa en tolueno.

Los productos obtenidos se observaron mediante CCF, utilizando como fase móvil una mezcla de éter de petróleo: dietil éter: ácido acético (60:40:1 vol/vol/vol) y se usó como patrón el ácido palmítico (PA). Las placas fueron reveladas con diclorofluoresceína.

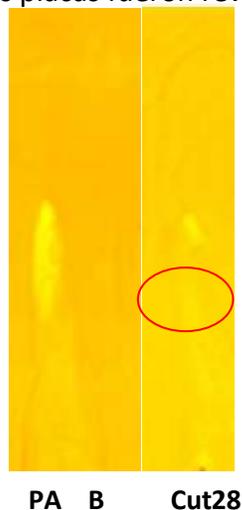


Figura 6.6: CCF de la reacción de hidrólisis de cutina revelada con diclorofluoresceína. PA: patrón de ácido palmítico (16C). B: Blanco de reacción Cut 28: reacción corrida con la enzima pura de 29 kDa

Como puede verse en la placa, la cutinasa de 29 kDa sí lleva a cabo la reacción y libera ácido palmítico del polímero de cutina; el cual es el ácido graso mayoritario de la cutina de manzana que se usó como sustrato (Holloway, 1973)

Obtención de los genes de las 2 cutinasas de *A. nidulans*

Los resultados de la caracterización de la enzima nativa de 29 kDa de *Aspergillus nidulans* muestran que se trata de una enzima termoestable y activa en el rango alcalino, con un claro potencial de aplicación en biocatálisis. Se procedió a aislar los genes de las 2 cutinasas encontradas en el grupo de trabajo para buscar una posible sobreexpresión de las mismas con fines de utilizarlas en reacciones biocatalíticas de interés, como la síntesis enantioselectiva y la degradación de compuestos tóxicos presentes en el ambiente. El material proteico podría servir también para estudios estructurales más finos, y el contar con los genes aislados podría ser útil para estudios moleculares sobre los factores que regulan la expresión de las mismas.

Las secuencias de genes reportados en la base de datos de *Aspergillus nidulans* son para la cutinasa de 22 kDa el AN5309 y para la cutinasa de 29 kDa el AN7541. Ambos se encuentran en cromosomas diferentes y presentan dos regiones no codificables, además el gen AN5309 tiene un péptido señal. La secuencia de cada uno de ellos se enlista a continuación (figuras 6.7 y 6.8):

```

AGCAGAACAGCCGGCCTCATCAAGGATATTCACATCCAACGCTCCCCTCAATCATAACAAGCAAAAT
GAAGCTCCAGCTCCACCTCGCCCTTTCCTCCTTGCCGCTATTGTGGCAGCGAATCCAATCCGTCT
CGATCAACGCCAGAGTATGCAAGAAGGGCTCTCTATTGCTTTTGAAGATGCATCTGCTAACCCCTAA
TGACAGTACGGGAAACGAGCTCCGCGACGGTTCCTGCCACGATGTCACCTTTATCTTCGCTCGTG
GCTCTACTGAGCTTGGGTACCTGGTGAGTGGCTTTATCATCAAGGTCAATCAGCAATACGAGACGC
TAACTATGAGCTCTAGGGCAGCACCGTTCGGGCCGCTACCTGCAATGTCTGAAACTCAGGAAGCC
CGGCCAAGTCGCATGCCAGGGCGTTGCGCCGGCGTATATCGCCGACCTGGCTTCTAACTTTCTGCC
ACAAGGAACGAACCAAATTGCTATTAACGAAGCCAAATCTCTTTTTGAACTCGCGGCGTCCAAGTG
CCCCAACACCAAGATCGTTCGCGGGTGGATACAGCCAGGGAGCGGCAGTCATGCATGCTGCCATCTC
GACGCTCTCGAGTACTGTTTCAGGACCAGATCAAGGGGGTGTCTCTTTGGCGACACGCGCAATAA
ACAGGATGGCGGACGTATTCCGAACCTTCCCACTGATAAGACAAAGATCATTTGTGCATTTGGTGA
TCTGGTTTTCGAGGGCAGCTCGTCATTACTGCGGCTCATCTTAGTTACATTGATGATGTTCCGGA
TGCTGCTGACTTTCTTGTGGGAAGCTTTAAAGTAGCTCACCTTCAAGTTTCTGCATCTGGGGTGAG
CCTGGTTTCCAGACCTTGGGGATTTTTTGGCTGGAATTCGAGATGTTTGTCTTTATTGGCGAGGCC
GCCGACAATAGTCCTGTATGGATATTGACGCAGAATGAATATGGATATTTTTTTCATACA

```

Figura 6.7 Secuencia del gen AN5309 que codifica para la cutinasa de 22 kDa de *A. nidulans*. En verde se marca el codón de inicio, y en rojo el de paro. Sombreado en gris se muestran las secuencias de los intrones

ATGCACCTTCAAACCTTCTGTCCCTTGCTGCTCTCGCTGGCTTGTCCGTTGCCAGTCCTTTGAATCTT
 GACGAGCGCCAGCGTACGTCTCTGCTTAGTTAAATGCCTACCAGGCCAGCTAACCAGACGCAGTCG
 GTAGCTCGAGCGGCAATGATCTCCGCGACGGCGACTGCAAGCCCGTCACCTTTATTTTCGCTCGCG
 CCTCCACTGAGCCCGGCCTTCTGGGCATGTGCGACTGGACCCGCCGTTTGCAATGACCTCAAGGCCG
 ATGCCTCTCTCGGCGGCGTAGCTTGTGAGGGTGTGGGCCGAAGTACACCGCGGGGCTGGCCGAGA
 ATGCTTTGCCTCAGGGAACCTCTAGCGCGCCATCAACGAGGCCAAGGAGCTCTTCGAACTGGCTG
 CCTCTAAGTGCCCTGACACAAGGATTGTAGCTGGTGGATACAGGTACGTCCCATCACTCTGCTCGT
 TCGCTCGCATTCCTAATGTATGGTTATGATAGTCAAGGAACGGCCGTCATGCACGGGGCGATCCC
 CGACCTCTCCGACGAGATCAAGGACAAGATCGCGGGTGTGCTACTCTTCGGCGACACCCGCAACAA
 GCAGGACGGCGGGCAGATCAAGAATTTCCCAAAGACAAGATCAAGATCTACTGCGCTACCGGTGA
 CCTGGTCTGCGATGGTACGTTGGTCGTTACCGCCGCGCATTTACCTACGTCGCAAACACAGGTGA
 AGCTTCCAAGTGGCTTGAGCAGCAACTCGCTTCCATGCCCGCCTCCACCTCCACCTCTAGCAGCTC
 TAGCAGCTCTTCATCTGCCCTGCTAGTCAAACCAGCCAGTCTAGCGGTCTCTCTAGCTGGTTCTC
 TGGCCTTGGTAAC **TGAG**GTGTGCTGTCATGGTCGGGCACGGTGCTGCGGATGGCCCGAGCCGATTT
 GTTTATGACCAGGGGCCTGGTACAGTGAGTGGTGCCTAGTAGTACACGATATTATACGAGGATTCT
 TTTTATGTACCTGTCCGAGGAACAAGTTCCAGTAGGCTATCCTTTTTAGACCTTTTAGCGACTC
 TA

Figura 6.8 Secuencia del gen AN7541 que codifica para la cutinasa de 29 kDa de *A. nidulans*. En verde se marca el codón de inicio y en rojo el de paro. Sombreado en gris se muestran las secuencias de los intrones

Diseño de cebadores:

Para el gen de la cutinasa de 22 kDa (AN5309) los cebadores diseñados fueron 5' **CCT GAA TTC ATG AAG CTC CAG CTC CAC CTC** 3' y 3' **TGA TCT AGA AGC TTC CCA ACA AGA AAG TCA** 5' en estos cebadores se insertaron los sitios de corte para las enzimas Eco RI y Xba I.

Para el gen de la cutinasa de 29 kDa (AN7541) los cebadores diseñados para la expresión fueron: 5' **CCT GAA TTC ATG CAC TTC AAA CTT CTG TCC** 3' y 3' **TGA TCT AGA TTA CCA AGG CCA GAG AAC CAG** 5'. Igualmente en estos cebadores se insertaron los sitios de corte para las enzimas Eco RI y Xba I.

Posteriormente se hizo un alineamiento de estos cebadores contra el genoma de *Aspergillus nidulans* y se encontró que sólo se alinearon contra la secuencia correspondiente al gen de la cutinasa de 22 o de 29 kDa respectivamente; con lo que se comprobó su especificidad.

Obtención de los genes a partir de ARN

Extracción de ARN total

Dado que los genes presentan 2 intrones (secuencias no codificantes pero que pueden verse involucradas en la regulación de la expresión y en procesamientos alteARNtivos como el splicing) fue necesario partir de cADN para la amplificación de los genes, ya que para poder clonar los genes dentro de un sistema de expresión es necesario utilizar la secuencia madura, es decir, sólo la codificante. Por tanto se realizó la extracción de ARN para obtener el gen maduro mediante una RT-PCR. Al decidirse por esta opción se partía de la premisa de que el procesamiento del gen no involucraba algún tipo de splicing alteARNtivo.

Para extraer el ARN se partió de los micelios congelados en nitrógeno líquido utilizando el kit RNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN. Se corrió un gel de FA al 1.5% para observar la integridad del ARN obtenido.

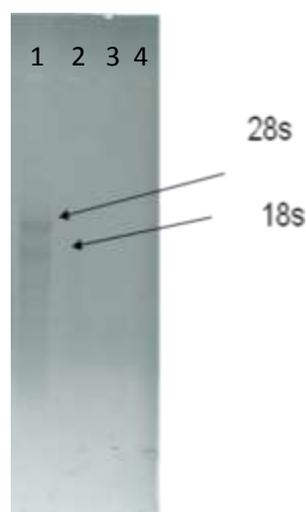


Figura 6.7: Determinación de integridad del ARN. FA al 1.5% Teñido con EtBr. Carril 1: ARN extraído del micelio de *A. nidulans*.

Se puede observar en la figura 6.7 que el ARN está en buenas condiciones, ya que se observan las 2 subunidades del ARN ribosomal, mientras que es imposible observar el ARNm debido a su muy baja concentración. Por tanto se usó como templado este ARN total para sintetizar el cADN en una reacción de RT-PCR en dos pasos, utilizando cebadores oligoT y una polimerasa con función de transcriptasa reversa.

El producto de esta reacción se utilizó como templado para PCR punto final para amplificar los genes maduros, es decir, sin intrones utilizando a la enzima Pfu ADN polimerasa

Los amplicones obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% (Figura 6.8):

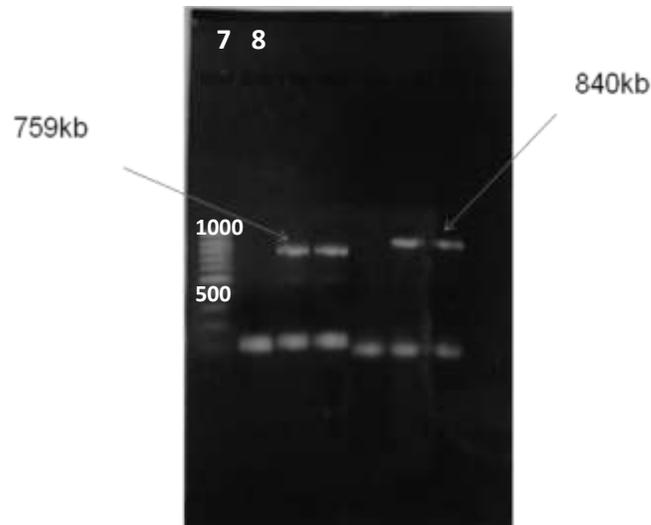


Figura 6.8: Análisis de los productos de amplificación de los genes *cut22* y *cut29*. Gel de agarosa al 1%. Resultados del RT-PCR. Carriles 1: Marcador de peso molecular MassRuler Low Range (Fermentas, 2: Blanco, 3 y 4: producto de amplificación del gen de la *cut22*, 5: Blanco, 6 y 7: producto de amplificación del gen de la *cut29*.

Sin embargo como se observa en la figura 6.8 los pesos obtenidos corresponden al peso de los genes con intrones, 759 bp para el gen de la *Cut22* y 840 bp para el gen de la *Cut29*, por lo que probablemente la muestra se contaminó con ADN genómico y el ARNm que se amplificó era una forma no madura, en la que no se había realizado todavía el corte de los intrones. Esto se comprobó mandando a secuenciar los productos de PCR a la empresa Macrogen (Korea) y efectivamente, en la secuencia se observó la presencia de los 2 intrones. Por lo tanto se buscó la extracción directa del ARNm.

Extracción directa de mRNA y RT-PCR de un solo paso

Se extrajo ARN mensajero a partir del micelio congelado de *A. nidulans* crecido en medio optimizado para la producción de las cutinasas de 22 y 29 kDa utilizando el kit Dynabeads ARNm Direct kit de Invitrogen. El ARNm obtenido se utilizó como templado para llevar a cabo una RT-PCR de un solo paso, utilizando una mezcla de dos enzimas, una transcriptasa reversa y una Taq polimerasa para así obtener los genes maduros en un sólo paso. Se corrió un gel de agarosa al 1% para observar las bandas obtenidas. Se usó como control el ADN genómico (con intrones).

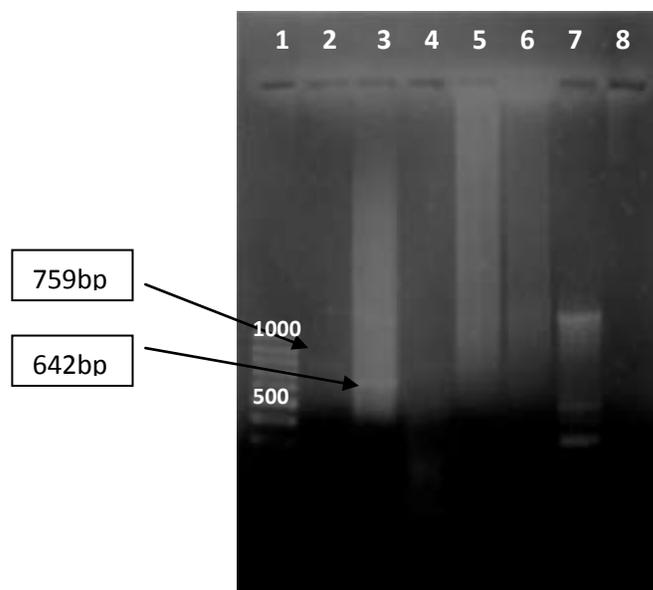


Figura 6.9: Gel de agarosa al 1% para observar los productos de amplificación del del RT-PCR a partir del micelio del hongo crecido en los diferentes medios de cultivo. Carriles 1: MPM MassRuler Low Range (Fermentas), 2: DNA con intrones, 3: Producto de amplificación del gen cut22 mediante RT-PCR, 4: Producto de amplificación del gen cut29 mediante RT-PCR.

Como se observa en la figura 6.9, se logró obtener el cADN de los genes de interés por lo que fue posible continuar con el siguiente paso que fue la amplificación de estos genes para su digestión y ligación al vector de clonación.

Amplificación del ADN maduro de los genes de interés

Una vez que se obtuvieron los cADNs para los genes cut22 y cut29 se buscó amplificarlos para obtener ADN en cantidad suficiente para los siguientes pasos en la construcción del vector de clonación. Sin embargo en numerosos intentos se obtuvieron bandas inespecíficas luego de correr un gel de agarosa al 1%, por lo que se decidió buscar otra estrategia para obtener los genes.

Síntesis de los genes de las cutinasas

Dado que no se consiguió amplificar nuevamente los genes de las 2 cutinasas a partir del ARN, se decidió mandar a sintetizar los genes a la compañía Epoch Biolabs, utilizando el servicio de Gene Synthesis. Los genes fueron entregados filtrados sobre papel filtro, del que se extrajeron utilizando buffer TE y agitación durante 2 h.

Se determinó la concentración del ADN extraído

Gen	1 medición (ng/μL)	2 medición (ng/μL)	Promedio (ng/μL)
cut22	6.119	5.560	6.781
cut29	6.387	5.789	6.088

Y se utilizó este ADN como templado para una PCR utilizando las condiciones de reacción que se habían utilizado anteriormente para la amplificación del ADN maduro.

Se corrió un gel de agarosa al 1% y una vez que se comprobaron los PM esperados de alrededor de 650 pb para el gen cut22 y de alrededor de 750 pb para el gen cut29, se purificaron las bandas y se mandaron a secuenciar. Se utilizó el GenRuler 1 kb Plus como marcador de peso molecular.

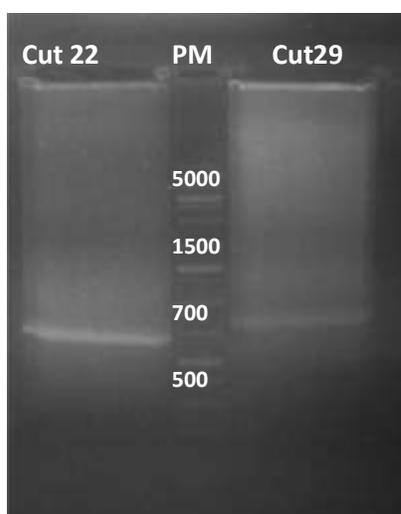


Figura 6.10: Amplificación de los genes de cutinasa a partir de genes sintéticos. Gel de agarosa al 1%. Carril 1 Gen de la cutinasa de 21 kDa. Carril 2: Marcador de peso molecular (Gen Ruler 1kb Plus, Fermentas) Carril 3: Gen de la cutinasa de 29 kDa

En la figura 6.10 se pueden observar las bandas esperadas de 642pb para el gen de la Cut22 y de 752 para el gen de la Cut29.

Construcción de los vectores pPICZαBcut22 y pPICZαBcut29 en *E. coli*

Doble digestión

Una vez que se comprobó la identidad de las secuencias de los genes, se prosiguió a realizar la doble digestión de los mismos y del plásmido para la expresión en *P. pastoris*. La doble digestión requiere la utilización de enzimas de digestión que corten el plásmido en un sitio único y que no corten la secuencia del gen.

Los cebadores fueron diseñados para ya contener estos sitios de restricción. Las enzimas utilizadas fueron EcoRI y XbaI, cuyos sitios de corte se muestran en la tabla 6.5:

Tabla 6.5: Sitios de corte y condiciones de reacción de las enzimas de restricción utilizadas

Enzima	Sitio de corte
EcoRI	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'
XbaI	5'---T CTAGA---3' 3'---AGATC T---5'

Observando la figura 6.11 se puede observar que la digestión se llevó a cabo de manera correcta ya que el plásmido digerido se linearizó observándose en el gel como una sola banda del peso reportado en un gel de agarosa al 1.5% por lo que la digestión se llevó a cabo correctamente. En el caso del pPICZαB este peso es de 3.6 kb según lo reportado por el proveedor.

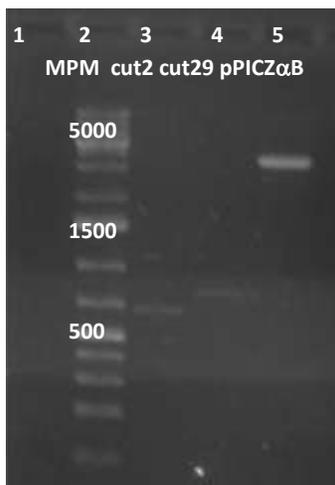


Figura 6.11: Doble digestión de los genes cut21 y cut29 y del plásmido pPICZαB utilizando las enzimas EcoRI y XbaI. Carril 2: MPM Gen Ruler 1kb Plus, Carril 3: Doble digestión del gen cut21. Carril 4: Doble digestión del gen cut29. Carril 5: Doble digestión del plásmido pPICZαB.

Ligación con la enzima ADN ligasa T4 de Fermentas.

Una vez que se llevó a cabo la doble digestión, se realizó la ligación entre el vector y el inserto utilizando la ligasa T4 (Fermentas).

La ligación se llevó a cabo a 16°C por 12 h y se detuvo después calentando la mezcla de reacción a 70°C por 5 min. Posteriormente se purificaron los productos de ligación

directamente de la mezcla utilizando el kit High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Se corrió un gel de agarosa para comprobar si se llevó a cabo la ligación y se observan las bandas de peso esperadas, cercanas a los 5000 bp (3.6 kb del plásmido más 642 o 759 bp de los genes).



Figura 6.12: Determinación de eficiencia de ligación. Gel de agarosa al 1% Carril 1: Marcador de Peso Molecular. Carril 2: Mezcla de ligación con gen cut21. Carril 3: Mezcla de ligación con gen cut29.

Como se observa en la figura **6.12** la ligación se llevó a cabo de manera adecuada pues se observa una banda de alrededor de 4.3kb en ambas reacciones; sin embargo también puede verse que la eficiencia de la ligación fue baja ya que esta banda no es muy intensa. Esto también puede deberse a que durante la purificación se pierde bastante material.

Transformación en *E. coli*

Una vez construido los plásmido recombinante con los genes de interés, se llevó a cabo la transformación de células de *E. coli* de la cepa DH5 α electrocompetentes. La transformación se llevó a cabo mediante electroporación y las células transformadas se extendieron en placas de agar LB con Zeocina. De las colonias que crecieron, se seleccionaron 10 de cada gen y se sembraron en medio líquido LB bajo en sales adicionado con Zeocina y se incubaron toda la noche a 37°C y 200 rpm. De los tubos que presentaron crecimiento se tomó una muestra para realizar PCR de colonia usando los cebadores específicos y los universales para promotor AOX del vector pPICZ α B con el fin de verificar que los genes estaban presentes en las clonas.

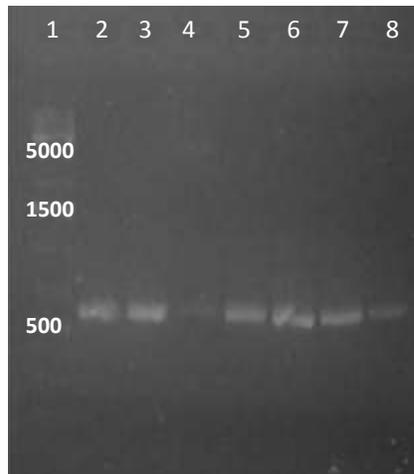


Figura 6.13: PCR de colonia de las clonas crecidas en medio LB-Zeocina, utilizando cebadores para el promotor AOX. Gel de agarosa 1%. Carril 1: MPM Gen Ruler 1kb Plus, Carriles 2 al 5: colonias presuntamente positivas para la construcción pPICZ α B-Cut22. Carriles 6-8: colonias presuntamente positivas para la construcción pPICZ α B-Cut29.

Sin embargo, al correr los geles de agarosa el tamaño observado correspondía al de la región del promotor/terminador del vector sin el inserto (592 bp) indicando que las células que se transformaron no contenían los genes de interés (figura 6.13). Esto quizá se deba al bajo rendimiento de la ligación por lo que se optó por optimizar las condiciones de la reacción modificando la cantidad de enzima, el tiempo y la proporción entre plásmido digerido e inserto (datos no mostrados). No se obtuvieron resultados positivos, por lo que se decidió ensayar la ligación utilizando una enzima de otro proveedor ya que quizá la ligasa utilizada hasta el momento no estaba funcionando correctamente.

Ligación con la ligasa T4 de NEB

Se realizó un nuevo ensayo de ligación cambiando las condiciones de la reacción y utilizando otra ADN ligasa (New England Biolabs). La doble digestión se realizó de igual forma que en el ensayo anterior y se ajustaron las condiciones de la ligación según lo especificado en apartado de Materiales y Métodos. Se usaron 10 μ L de las mezclas de ligación para transformar células electrocompetentes *E. coli* DH5 α mediante electroporación. Las células resultantes se sembraron en placas de medio LB con Zeocina y se seleccionaron colonias para crecer en medio líquido y realizar nuevamente PCR de colonia.

Selección de clonas de interés mediante PCR de colonia con cebadores específicos

Se seleccionaron 20 colonias de cada gen, y se realizó un PCR de colonia utilizando cebadores específicos y siguiendo las condiciones enlistadas anteriormente. Se corrieron geles de agarosa al 1% para visualizar los fragmentos amplificados.

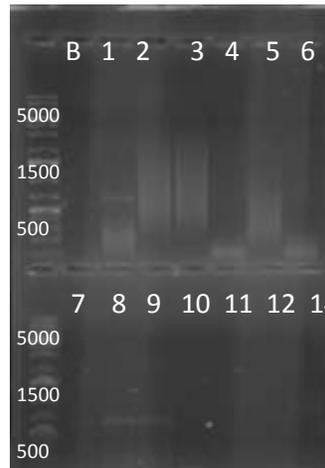


Figura 6.14: PCR de colonia para gen de la cutinasa de 22kDa. Gel de agarosa 1%. En cada carril se cargó la reacción corrida a partir de una clona presuntamente positiva.

Y como se ve en la figura 6.14 se encontraron 4 colonias positivas para el gen AN5309: **1, 8, 9 y 14**. Se prosiguió a guardar estas colonias en glicerol y a extraer plásmido para verificar por secuenciación que la construcción era la esperada.

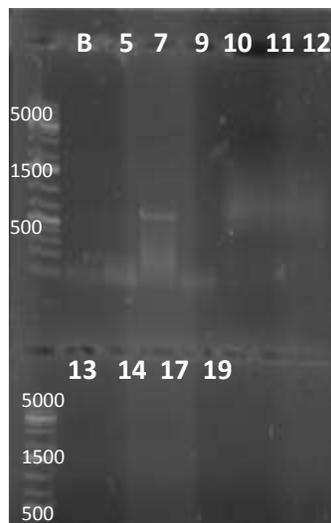


Figura 6.15: PCR de colonia para gen de la cutinasa de 29kDa. Gel de agarosa 1%. En cada carril se cargó la reacción corrida a partir del ADN obtenido de una colonia presuntamente positiva. La letra B indica el blanco de reacción.

Se encontró únicamente 1 colonia positiva: la 7. Para ambos genes, las clonas positivas se conservaron en glicerol y -70 °C; previamente se extrajo plásmido para secuenciar y verificar que la construcción no presentara mutaciones y contuviera el gene de interés. Los resultados de la secuenciación indican que se logró obtener un vector estable que contenía el gen de la cutinasa de 22 kDa al que se nombró como **pPICZ α Bcut22** y que será utilizado para la expresión de la proteína en *Pichia pastoris*. Sin embargo, no fue posible obtener un vector estable para la clonación del gen AN7541 que codifica para la cutinasa de 29 kDa. Después de numerosos intentos, la ligación no funcionó por lo que se decidió seguir adelante con la expresión únicamente de la cutinasa de 22 kDa.

Expresión del gen de la cutinasa de 22 kDa en *Pichia pastoris*

El primer paso para la expresión del vector en la levadura *P. pastoris*, consistió en la linearización del vector pPICZ α Bcut22 con la enzima Pme I y poder llevar a cabo después la transformación mediante recombinación homóloga la cual permite que el gen de interés se inserte dentro del cromosoma de la levadura (Cereghino & Cregg, 2000). Se corrió un gel de agarosa al 1.5% para verificar el resultado de la linearización (figura 6.16).

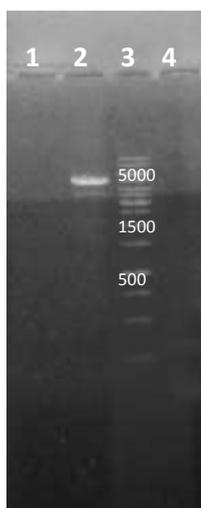


Figura 6.16: Gel de agarosa al 1.5% para comprobar la linearización del vector pPICZ α Bcut22. Se observa una sola banda en el carril 2 alrededor de 4200bp que corresponde al peso esperado para la construcción. Carril 3: MPM Gene Ruler 1kb Plus de Fermentas.

Una vez linearizado el vector, y teniendo las células de *Pichia pastoris* competentes para electroporación, se llevó a cabo la transformación siguiendo el protocolo mencionado en el apartado de Materiales y Métodos. Las células transformadas y recuperadas en sorbitol se plaquearon en cajas de medio YPD adicionado con Zeocina y de las colonias formadas se seleccionaron 10 para sembrarlas en medio YPD adicionado con Zeocina y Tributirina al 1.5% para observar la actividad de esterasa de la enzima expresada como halos de

hidrólisis (figura 6.17). A estas cajas se les adicionó metanol cada 24 h y se incubaron durante 3 días. Se seleccionaron las cuatro colonias que presentaron los mayores halos de hidrólisis para verificar mediante PCR que el gen estuviera presente.

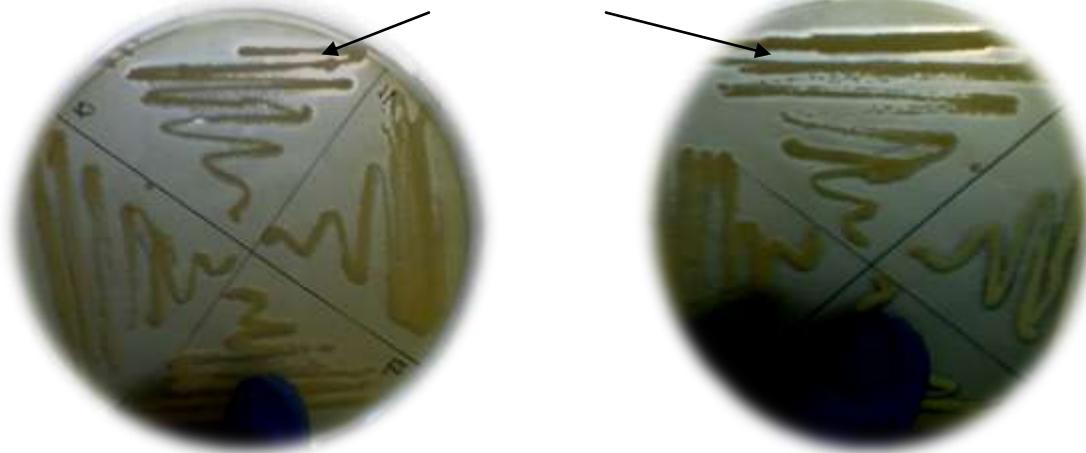


Figura 6.17: Ejemplo de las clonas de *P. pastoris* transformadas con el vector pPICZ α Bcut22 en medio YPDZ con Tributirina. Las flechas señalan las colonias positivas para la hidrólisis del compuesto lipídico.

Las colonias seleccionadas fueron la **1, 2, 9, y 10**. Se extrajo ADN de dichas colonias y se utilizó como templado para una PCR utilizando los cebadores universales para la región promotora. Al estar integrado el gen ahora al ADN genómico dió como resultado una banda del tamaño del gen de interés y otra correspondiente al tamaño del gen del promotor AOX (aproximadamente 3.2 kb); la presencia de esta segunda banda se debe a que dentro del genoma de *Pichia pastoris* existen dos copias del gen del promotor AOX, la AOX1 que es la que utilizamos para insertar el gen de interés y la AOX2 que se mantiene sin cambios y que permite a la levadura tener la capacidad de crecer en metanol.

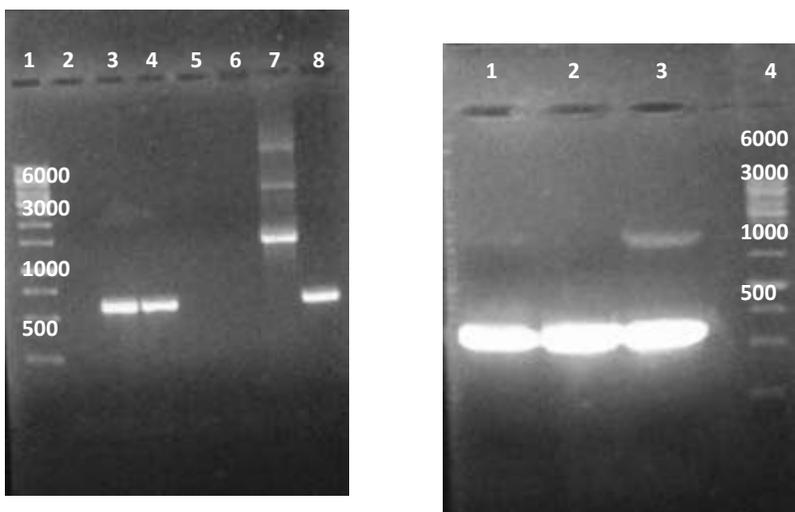


Figura 6.18: Gel de agarosa al 1.5% PCR con cebadores universales AOX de clonas que presentaron halos de hidrólisis de Tributirina. Carril 1: Clona pPICZ α Bcut22-1, Carril2: Clona pPICZ α Bcut22-2, Carril 3:Clona pPICZ α Bcut22-9, Carril 4: MPM Gene Ruler 1kb de Fermentas.

Los resultados del PCR demostraron la presencia de 3 clonas que contienen el gen de la cutinasa de 22 kDa, ya que en el gel se observa una banda por arriba de los 500 bp que corresponde al peso esperado para el inserto. Por tanto, estas clonas nombradas pPICZ α Bcut22-1 pPICZ α Bcut22-2 y pPICZ α Bcut22-9 se utilizaron para la inducción y expresión de la proteína recombinante en medio líquido.

Inducción de la cutinasa de 21 kDa en *P. pastoris* en medio líquido

Se seleccionaron las clonas pPICZ α Bcut21-1 y pPICZ α Bcut21-9 para realizar un ensayo de inducción con metanol; además se incluyó como control negativo la cepa X-33. Primero se generó suficiente biomasa, creciendo a la levadura en medio BMGY que utiliza glicerol como fuente de carbono, una vez alcanzada la fase log de crecimiento y la D.O. adecuada, se centrifugaron las células y se resuspendieron en el medio de inducción que contiene metanol. Se midió actividad de esterasa con α -NA en el sobrenadante, según se aprecia en la figura 6.19, puesto que el vector utilizado contiene un péptido-sígnal que permite la secreción de la proteína y esta actividad se encontró a partir de las 24 h alcanzando un máximo a las 96 h de inducción. Para otras cutinasas recombinantes, como la de *F. solani* expresada en *P. pastoris* el tiempo de producción es similar; ya que se ha reportado actividad en el sobrenadante a partir de las 24 h y se ve un aumento significativo a las 96 h (Kwon et al., 2009).

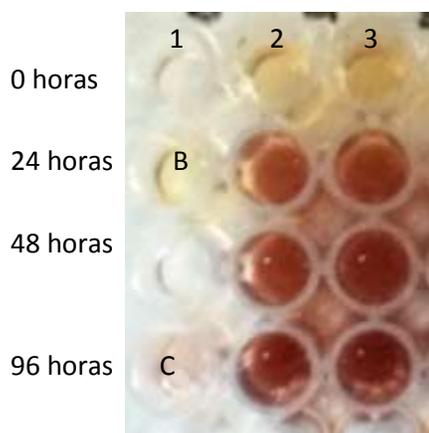


Figura 6.19: Medición de la actividad cualitativa a diferentes tiempos de inducción. Columna 2: clona pPICZ α Bcut22-1. Columna 3: pPICZ α Bcut22-9. En el segundo pozo de la 1era columna está el blanco del medio (B) y en el 4º pozo de esa misma columna el control *Pichia X-33* (C) a las 96 h tratado bajo las mismas condiciones de inducción.

7. Conclusiones

- Las características bioquímicas de la cutinasa de 29 kDa (ANCUT2) indican que es una enzima activa a altas temperaturas (60 °C) y a pH alcalino.
- Además la enzima resultó ser termoestable, ya que conserva más del 80% de actividad después de incubarse a 60°C durante 1 hora. La enzima además resiste valores de pH básicos de hasta 10 durante 1 y 3 horas, manteniendo una actividad residual por arriba del 80%.
- La cutinasa de 29 kDa tiene potencial biocatalítico al resistir temperaturas altas y pH básico durante tiempos prolongados, es decir, al ser termoalcalina.
- La cutinasa de 22 kDa tiene una marcada preferencia por ésteres de cadena corta aunque también presenta buena actividad frente a ésteres de ácidos grasos de cadena larga (50% en relación a los de cadena corta), principalmente de 16 y 18C que son los principales constituyentes de su sustrato natural, la cutina; y es más baja la actividad contra los de ésteres cadena intermedia (20%).
- Así mismo, es capaz de hidrolizar cutina liberando ácido palmítico (16C). Esta reacción se llevó a cabo en tolueno.
- Se calcularon los parámetros cinéticos de la enzima para la hidrólisis de *p*-NPA. La cutinasa presenta una *K_m* de 6.8 mM, una *V_{max}* de 33.3 mmol/min, una *k_{cat}* de 241 min⁻¹ y una eficiencia catalítica de 35.19 mmol⁻¹ min⁻¹. Comparando con otras carboxilesterasas los parámetros encontrados están dentro del rango esperado aunque existe un amplio margen para mejorar la eficiencia de estas enzimas lo que abre las puertas para realizar evolución dirigida sobre estas proteínas.
- La mutagénesis de las cutinasas será posible en un futuro pues se obtuvieron los genes maduros que codifican para la cutinasa de 29 kDa y también para la otra cutinasa encontrada en el grupo de trabajo, de 22 kDa y se clonaron en un vector de expresión para ser usado en *Pichia pastoris*.
- Se llevó a cabo la expresión de la proteína de 22 kDa, la cual se encontró activa en el sobrenadante a partir de las 24 h de fermentación; sin embargo no se observó actividad en zimograma pese a que la banda de la proteína se observó claramente

en geles SDS-PAGE teñidos con plata. Por todo esto es necesario optimizar las condiciones de producción.

- Esta cutinasa, de 22 kDa también se caracterizó de forma nativa (Vega, tesis en proceso) y se encontró que es igualmente termoestable y alcalina; sin embargo no se logró observar su capacidad de hidrólisis de cutina, lo que se explica porque su perfil de hidrólisis de sustratos es preferentemente hacia los de cadena corta y su actividad frente a ésteres de cadena larga es menor que la de la cutinasa de 29 kDa.

8. Perspectivas

Por todo lo anterior, todavía quedan muchas preguntas por resolver. Por ejemplo, el hecho de que las condiciones de producción de ambas enzimas sean tan diferentes y de que no reaccionen de la misma forma a la inducción con cutina que según los reportes es el principal inductor de este tipo de enzimas. Además de que el perfil de hidrólisis de la cutina también es muy diferente ya que la cutinasa de 22 kDa no libera los monómeros de ácido graso esperados y la de 29 kDa por el contrario sí lo hace (Castro-Ochoa et al., 2012). Todo esto nos lleva a pensar que el modo de acción de cada una de las cutinasas encontradas en el grupo de trabajo es diferente, probablemente sus sitios blancos sean distintos y los momentos de acción in vivo al momento de la invasión al tejido de las plantas también sean diferentes, como se ha visto que ocurre con otras enzimas líticas de hongos fitopatógenos como *F. solani* f. sp. *pisi*, (Rocha, et al 2008., Hynes et al 2006). Por todo esto, es necesario conocer y analizar los sistemas regulatorios tanto a nivel transcripcional como postranscripcional de ambas enzimas para encontrar si debido a ellos es que existen tan marcadas diferencias en el modo de acción y en la producción de estas dos cutinasas. Se pretende, entonces, optimizar la expresión de las 2 cutinasas en un sistema heterólogo, utilizando a *Pichia pastoris* como organismo hospedero, caracterizar las enzimas recombinantes y compararlas con las enzimas nativas, para poder explicar las diferencias existentes entre la producción de la cutinasa de 22 kDa y la de 29 kDa así como sus diferencias en el patrón de hidrólisis de cutina. Se debe investigar también el modo en que se regulan estas cutinasas para proponer un sistema cutinolítico y compararlo con el único que se ha reportado hasta el momento, que es el de *Fusarium solani*.

9. Bibliografía

Badenes SM, Lemos F & Cabral JMS (2010), Transesterification of oil mixtures catalyzed by microencapsulated cutinase in reversed micelles, *Biotechnol Lett* 32(1):399–403

Barr KA, Hopkins SA, & Sreekrishna K (1992), Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*, *Pharm Eng* 12(1):48-51

Berka RM, Dunn-Coleman N & Ward M (1992), Industrial enzymes from *Aspergillus* species. In: *Aspergillus* Biology and Industrial Applications, Bennett JW & Klich MA (eds), Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA 152-202

Bordusa F (2002), Proteases in organic synthesis, *Chem Rev* 102(12):4817-4867

Bornscheuer, UT (2002), Microbial carboxyl esterases: classification, properties and applications in biocatalysis, *FEMS Microbiol Rev* 26(1):73-81

Carneiro-da-Cunha MG, Melo EP, Cabral JMS & Aires-Barros MR (1996) Liquid-liquid extraction of a recombinant cutinase from fermentation media with AOT reversed micelles, *Bioprocess Eng* 15(1):151-157

Carvalho C, Serralheiro MLM, Cabral JMS & Aires-Barros MLR (1998) Cutinase structure, function and biocatalytic applications, *Electron J Biotechnol* 1(3):160-173

Castro-Ochoa D, Peña-Montes C, González-Canto A, Alva-Gasca A, Esquivel-Bautista R, Navarro-Ocaña A & Farrés A (2012), AN CUT2, an extracellular cutinase from *Aspergillus nidulans* induced by olive oil, *Appl Biochem Biotechnol* 166(5):1275-1290

Cereghino JL & Cregg JM (2000), Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *FEMS Microbiol Rev* 24(1):45-66

Chakravorty D, Parameswaran S, Dubey VK & Patra S (2012), Unraveling the rationale behind organic solvent stability of lipases, *Appl Biochem Biotechnol* 167(1):439–461

Chen S, Su L, Billig S, Zimmermann W, Chen J & Wu J (2010), Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca*, *J Mol Catal B-Enzym* 63(1):121–127

Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill & Stillman CA (1989), Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*, *Mol Cell Biol* 9(3):1316-1323

Creveld JM, Meijberg W, Berendsen HJC & Pepermans HAM (2001), DSC studies of *Fusarium solani pisi* cutinase: consequences for stability in the presence of surfactants, *Biophys Chem* 92(1):65-75

- Dickman M & Suresh P (2009), Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* are nonpathogenic to papaya fruit, *Physiol Molec Plant Pathol* 28(2):235-242
- Dutta, K, Sen S & Veeranki VD (2009), Production, characterization and applications of microbial cutinases, *Process Biochem* 44(2):127–134
- Egmond V & Bommel CJ (2000), Impact of structural information on understanding lipolytic function, *Methods Enzymol B* 284(1):199-129
- Espelie KE, Davis RW & Kolattukudy PE (1980), Composition, ultrastructure and function of the cutin-and suberin-containing layers in the leaf, fruit peel, juice-sac and inner seed coat of grapefruit (*Citrus paradise* Macfed.) *Planta* 149(5):498-511
- Esqueda-Domínguez KL (2012), Producción, Identificación y Caracterización de una cutinasa de *Aspergillus nidulans* PW1, Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM
- Fett W, Wijey C, Moreau R & Osman S (1999), Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria, *Lett Appl Microbiol* 31(1):25-29
- Flurkey WH & Kolattukudy PE (1981), *In vitro* translation of cutinase ARNm: Evidence for a precursor form of an extracellular fungal enzyme, *Arch Biochem Biophys* 212(1):154-161
- Hynes MJ, Murray SL, Duncan A, Khew GS & Davis MA (2006), Regulatory genes controlling fatty acid catabolism and peroxisomal
- Holloway P (1973), Cutins of *Malus pumila* fruits and leaves, *Phytochem* 12(12):2913-2920
- Jeong GT & Park DT (2008), Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oil for biodiesel production with tert-butanol, *Appl Biochem Biotechnol* 148(3):131–139
- Kademi A, Ait-Abdelkader N, Fakhreddine L & Baratti JC (2000), Characterization of a new thermostable esterase from the moderate thermophilic bacterium *Bacillus circulans*, *J Mol Catal B-Enzym* 10(4):395-401
- Kapat A, Zimand Y & Elad Y (1998), Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*, *Physiol Mol Plant Pathol* 52(1): 127-137
- Kikot GE, Hours RA & Alconada TM (2008), Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review, *J Basic Microbiol* 48(1):1–11
- Kolattukudy PE (1980), Cutin, suberin and waxes, In PK Stumpf (ed), *The biochemistry of plants, 4: Lipids: Structure and Function*, Academic Press, NY 571-645
- Laemmli, UK, (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227(5259):680-685

Lauwereys M, Martinez C, de Geus P, Matthyssens G Cambillau G (1991) *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent, *Nature* 356(6370):605-618

Lee MH, Chiu CM, Roubtsova T, Chou CM, Bostock RM (2010), Overexpression of a redox-regulated cutinase gene, MfCUT1, increases virulence of the brown rot pathogen *Monilinia fructicola* on *Prunus spp*, *Mol Plant Microbe Interac* 23(2):176-186

Li D, Sirakova T, Rogers L, Ettinger WF & Kolattukudy PE (2002), Regulation of constitutively expressed and induced cutinase genes by different zinc finger transcription factors in *Fusarium f. sp. pisi* (*Nectria haematococca*), *J Biol Chem* 277(10):7905-7912

Lias NM, Abu-Bakar FD, Othman R, Zamrod Z, Nathan S, Munir A, Murad A & Mahadi NM (2004), Cloning and expression of the *Glomerella cingulata* cutinase recombinant gene in the yeast, *Pichia pastoris*, The 4th Annual Seminar of National Science Fellowship, Malasia Diciembre 20-21

Liu L, Gosser Y, Baker PJ, Ravee Y, Lu Z, Alemu G, Li H, Butterfoss GL, Kong X, Gross R & Montclare JK (2009), Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: enhanced thermostability and hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation, *J Am Chem Soc* 131(1):15711–15716

Longhi S, Czjzek M, Lamzin V, Nicolas A & Cambillau C (1996), Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solanicutinase*: stereochemical analysis, *J Mol Biol* 268(4): 779-799

Lountos GT, Riebel BR, Wellborn WB, Bommarius AS & Orville AM (2004), Crystallization and preliminary analysis of a water-forming NADH oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Acta Crystallogr: D* 60(11):2044-2047

MacCabe AP, Orejas M, Tamayo EN, Villanueva A & Ramón D (2002), Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*, *J Biotechnol* 96(1):43-54

Maeda H, Youhei Y. Keietsu A, Fumihiko H, Masayuki M, Ryoji I, Katsuya G & Tasuku N (2002), Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*, *Appl Microbiol Biotechnol* 67(1):778–788

Masaki K, Kamini R, Hiroko I & Iefuji H (2005), Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus sp.* strain S-2 hydrolyzes polylactic acid and other biodegradable plastics, *Appl Environ Microbiol* 71(11):7548–7550

McQueen R & Schottel J (1987), Purification and characterization of a novel extracellular esterase from pathogenic *Streptomyces scabies* that is inducible by zinc, *J Bacteriol* 169 (5):1967-1971

- Melo EP, Baptista RP & Cabral JMS (2003), Improving cutinase stability in aqueous solution and in reverse micelles by media engineering, *J Mol Catal B-Enzym* 22(3):299–306
- Nagao T, Shimada Y, Sugihara A, & Tominaga Y (2002), Increase in stability of *Fusarium heterosporum* lipase, *J Mol Catal B-Enzym* 17(1):125–132
- Niehaus F, Bertoldo C, Kähler M & Antranikian G (1999), Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application, *Appl Microbiol Biotechnol* 51(6):711-729
- Ohnishi K, Yoshida Y, Toida J, & Sekiguchi J (1994), Purification and characterization of a novel lipolytic enzyme from *Aspergillus oryzae*, *J Ferment Bioeng* 78(5):413–419
- Panda T & Gowrishankar BS (2005), Production and applications of esterases, *Appl Microbiol Biotechnol* 67(2):160-169
- Peña-Montes C, González A, Castro-Ochoa LD & Farrés A (2008) Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*, *Appl Microbiol Biotechnol* 78(5):603-12.
- Petersen SB, Fojan P, Petersen EI, Neves-Petersen MT (2001), The thermal stability of the *Fusarium solani* pisi cutinase as a function of pH, *J Biomed Biotechnol* 1(2):62-69
- Prim N, Sánchez M, Ruiz C, Pastor FJ & Diaz P (2003), Use of methylumbeliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization, *J Mol Catal B-Enzym* 22(5-6):339-346
- Regado MA, Cristovao BM, Moutinho CG, Balcao VM, Aires-Barros R, Ferreira JPM & Malcata FX (2007), Flavour developmet via lipolysis of milkfats: Changes in free fatty acid pool, *Int J Food Sci Tech* 42(8):961-968
- Rivera-Pérez C, García-Carreño FL & Saborowski R, (2010) Digestive lipase activity through development and after fasting and re-feeding in the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*, *Aquaculture*, 300(1-4):163-168
- Rivera-Pérez C, García-Carreño FL & Saborowski R (2011) Purification and Biochemical Characterization of Digestive Lipase in Whiteleg Shrimp, *Mar Biotechnol*, 13(2):284-295
- Rocha AL, Pietro A, Ruiz-Roldán C & Roncero MIG (2008), Ctf1, a transcriptional activator of cutinase and lipase genes in *Fusarium oxysporum* is dispensable for virulence, *Mol Plant Pathol* 9(3):293-304
- Rubio M, Cardoza E, Hermosa R, Gutiérrez S & Monte E, Cloning and characterization of the Thcut1 gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34, *Curr Genet* 54(6):301-312
- Sarka S, Sreekanth B, Kant S, Banerjee R & Bhattacharyya BC (1998), Production and optimization of microbial lipase, *Bioprocess Eng* 19(1):29-32

Sebastian J & Kolattukudy P (1988), Purification and characterization of cutinase from a fluorescent *Pseudomonas putida* bacterial strain isolated from phyllospher, Arch Biochem Biophys 263(1):77-85

Segel IH (1982), Cálculos de Bioquímica, Ed. Acribia 3ª ed, España

Sharma R, Chisti Y & Banerjee UC (2001), Production, purification, characterization, and applications of lipases, Biotechnol Adv 19(8):627-662

Speranza P, Carvalho PDO & MacEdo GA (2011), Effects of different solid state fermentation substrate on biochemical properties of cutinase from *Fusarium sp*, J Mol Catal B-Enzym 72(3-4):181-186

Stamatis H, Sereti V & Kolisis F (1999), Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants, J Am Oil Chem Soc 76(12):1505-1510

Taiz L & Zeiger E (2002), Plant physiology, Freeman, 3a ed. USA 320-332

Tanabe K, Syoyo N & Keisuke K (1988), Pathogenicity of cutinase and pectic enzymes-deficient mutants or *AlteARNria alteARNta*, Ann Phytopath Soc Japan 54(2):552-555

Takao M, Nakaniwa T, Yoshikawa K, Terashita T & Sakai T (2000), Molecular cloning, ADN sequence, and expression of the gene encoding for thermostable pectate lyase of thermophilic *Bacillus sp*. TS 47, Biosci Biotechnol Biochem 65(2):322-329

Thomsen MS & Nidetzky B (2008), Microfluidic reactor for continuous flow biotransformations with immobilized enzymes: the example of lactose hydrolysis by a hyperthermophilic β -glycoside hydrolase, Eng Life Sci 8(1):40-48

Trail F & Koller W (1990) Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: Evidence for a relationship between enzyme properties and tissue specificity, Physiol Mol Plant Pathol 36(4):495-508

van Gemeren IA, Beijersbergen A, Musters W, Gouka RJ, van den Hondel CAM & Verrips CT (1998), The effect of pre- and pro-sequences and multicopy integration on heterologous expression of the *Fusarium solani pisicutinase* gene in *Aspergillus awamori*, Appl Microbiol Biotechnol 45(6):755-763

van Kan JA, van 't Klooster JW, Wagemakers CA, Dees DT & van der Vlugt-Bergmans CJ (1997), Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato, Mol Plant Microbe In 10(1):30-38

van Kuyk PA, Cheetham BF & Katz ME (2000), Analysis of two *Aspergillus nidulans* genes encoding extracellular proteases, Fungal Genet Biol, 29(3):201-210

Aspergillus Comparative Database:

www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group

Mult Alin: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

Oligo Analyzer: <http://www.idtADN.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>

Anexo A: Medio de cultivo utilizados

A) Medio LB bajo en sales

El medio LB es necesario cuando se utiliza Zeocina como antibiótico; debido a que las sales disminuyen la actividad del mismo.

Composición:

1% Triptona de carne

0.5% Extracto de levadura

0.5% NaCl

pH 7.0

Esterilizar en autoclave y dejar enfriar a 55°C antes de añadir el antibiótico.

Para placas de agar, añadir 1.5g/L de agar después de ajustar el pH.

B) Medios SOC y SOB

2% Bactotripton

0.5% Extracto de levadura

0.05% NaCl

2.5 mM KCl, pH 7

10 mM MgCl₂

20 mM Glucosa (para el medio SOC)

Para el medio SOB disolver 20 g de bactotripton 5 g de extracto de levadura y 0.5 g de NaCl en 950 ml de agua desionizada. Agregar 10 ml de KCl 250 mM y ajustar el pH a 7 utilizando HCl. Esterilizar en autoclave. Dejar enfriar y posteriormente agregar MgCl₂ a una concentración final de 10 mM.

Para el medio SOB añadir al medio SOC esterilizado y enfriado Glucosa 10X (20%) para una concentración final de 20 mM.

C) Medio YPD(Z)

Composición:

1% Extracto de levadura

2% Peptona de carne

2% Glucosa

100 µg/mL Zeocina

Disolver en agua el extracto de levadura y la peptona de carne. Esterilizar en autoclave y dejar enfriar a 60°C antes de añadir la glucosa 10X y el antibiótico.

Para medio sólido añadir 2g/L de agar antes de esterilizar. Las cajas con antibiótico deben guardarse a 4°C en oscuridad; su vida media es de 1-2 semanas.

D) Medio BMGY o BMMY para expresión e inducción en *P. pastoris*

Composición:

1% Extracto de levadura

2% Peptona de carne

100 mM Fosfato de Potasio pH 6.0

1.34% YNB

4x10⁻⁵ % Biotina

1% glicerol o 0.5% de metanol

Disolver el extracto de levadura y la peptona de carne en agua; esterilizar en autoclave y posteriormente añadir el fosfato de potasio, las bases nitrogenadas (YNB), la biotina y el glicerol (BMGY) o metanol (BMMY). La vida media del medio preparado es de 2 meses bajo refrigeración (4 °C).

Anexo B: Soluciones stock para preparar medios de cultivo

YNB 10X (Bases Nitrogenadas con Sulfato de Amonio sin Aminoácidos)

Disolver 134g de YNB con Sulfato de Amonio sin Aminoácidos en 100 mL de agua y esterilizar por filtración. Calentar la solución para disolver las YNB completamente. Almacenar a 4 °C hasta por un año.

Biotina 500X (0.02% Biotina)

Disolver 20 mg de biotina en 100 mL de agua y esterilizar por filtración. Almacenar a 4 °C hasta por un año.

Glucosa 10X (20%)

Disolver 200g de D-Glucosa en 100 mL de agua. Esterilizar en autoclave 15 minutos o preferentemente esterilizar por filtración. La vida útil de esta solución es de un año.

Metanol 10X (5%)

Mezclar 5 mL de metanol con 10 mL de agua. Esterilizar por filtración y almacenar a 4 °C. La vida útil de esta solución es de aproximadamente dos meses.

Glicerol 10X (10% Glicerol)

Mezclar 100 mL de Glicerol con 900 mL de agua. Esterilizar en autoclave o por filtración. Almacenar a temperatura ambiente. La vida útil es mayor a un año.

Buffer de Potasio 1M, pH 6.0

Combinar 132 mL de K_2HPO_4 1M, 868 mL de KH_2PO_4 1M y asegurarse de que el pH es de 6.0 (si es necesario ajustarlo, utilizar ácido fosfórico o KOH). Esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente. La vida útil de este buffer es mayor a un año.

KCl 250 mM, pH 7

Disolver 1.86 g de KCl en 100 ml de H_2O desionizada. Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

$MgCl_2$ 2 mM

Disolver 19 g de $MgCl_2$ en 90 ml de H_2O , llevar el volumen a 100 ml y esterilizar en autoclave.

Anexo C: Cosecha y conteo de esporas

Cosecha de esporas.

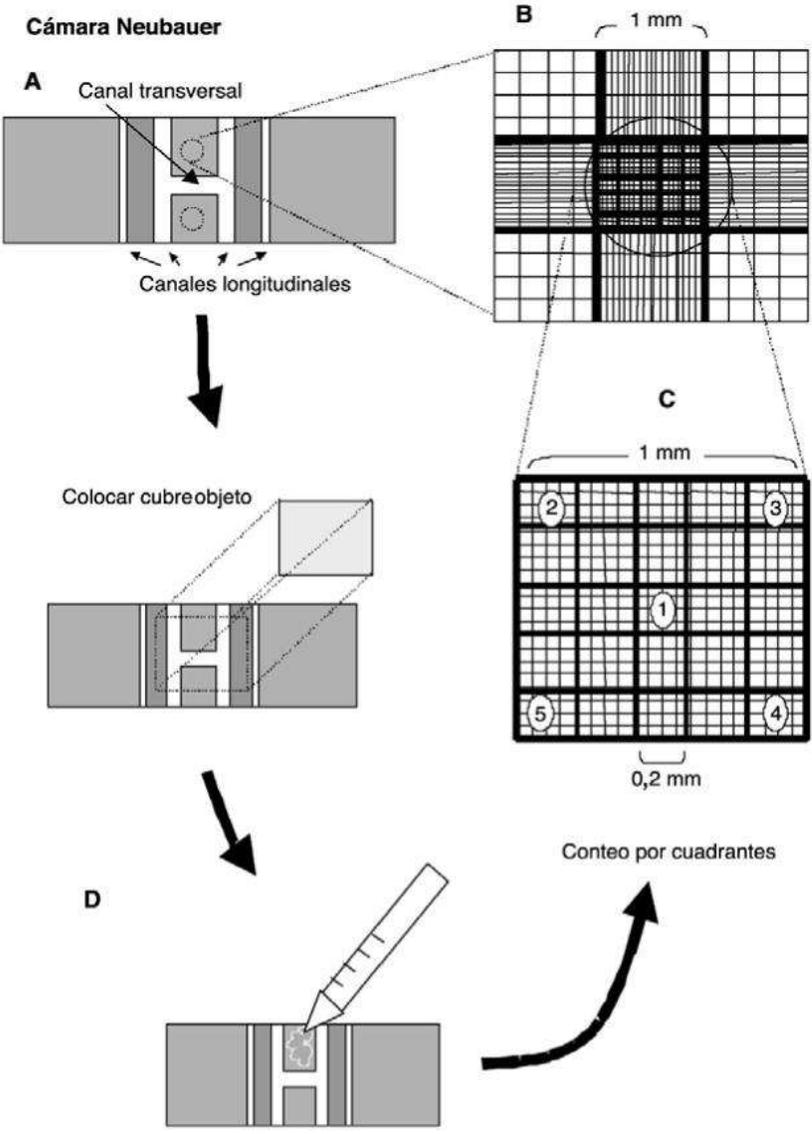
Sobre la caja petri de medio mínimo donde se sembraron los granos de sílica se adicionaron 10 mL de la solución de Tween 80 al 0.1%. Posteriormente se rasparon las esporas con una asa micológica y se recuperaron en un tubo desechable Falcon de 50 mL. Se centrifugaron las esporas durante 10 min a 8500 rpm (Centrifuga Biofuge Primo R). El sobrenadante se desechó y se adicionaron 10 mL de agua destilada filtrada y esterilizada y se realizó otra centrifugación con las condiciones descritas anteriormente. Esta operación se repitió 2 veces y finalmente las esporas se resuspendieron en 5 mL de agua destilada. Se almacenaron a 4°C y se realizó un conteo de esporas en el microscopio con un hematocitómetro (Cámara de Neubauer).

Conteo de esporas

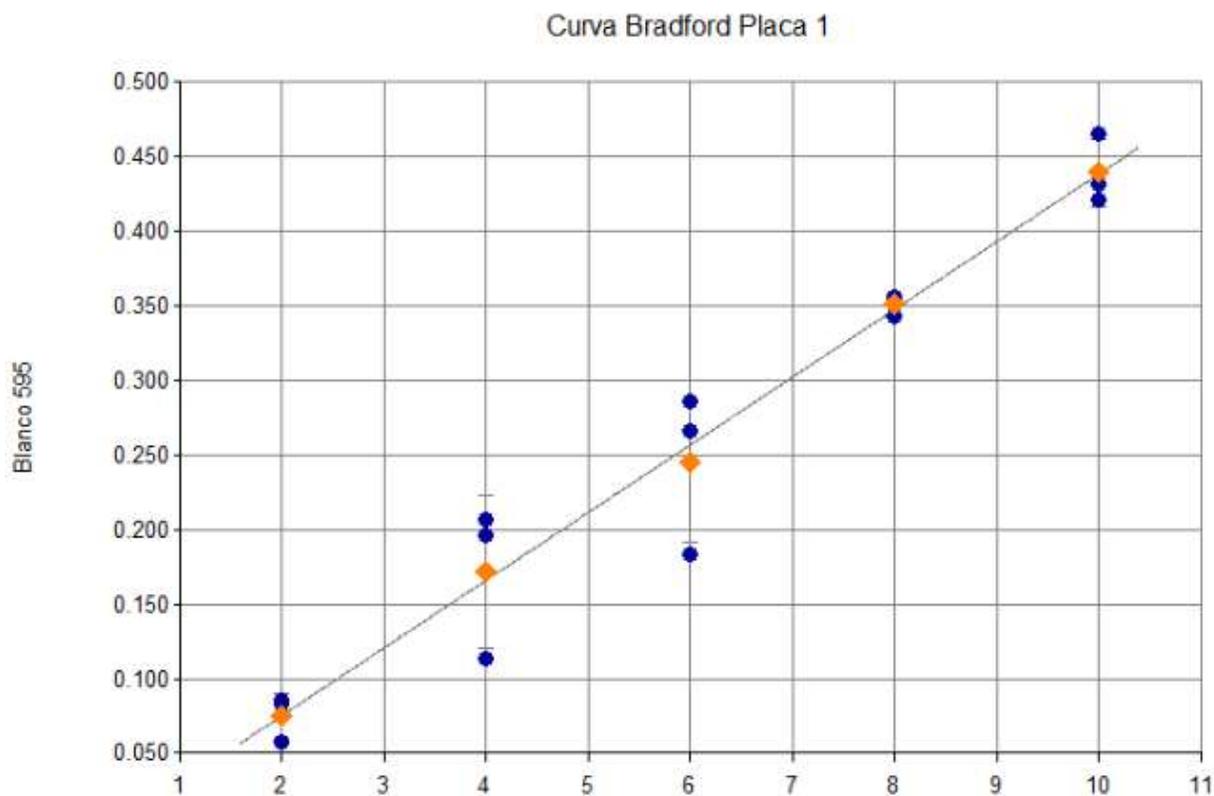
Se hizo una dilución de las esporas cosechadas 10 µL de solución de esporas en 990 µL de agua destilada. El conteo se realizó con la ayuda de una cámara de Neubauer. Para ello se colocó un cubreobjetos sobre la cámara, posteriormente en las ranuras de ésta se colocó aproximadamente una gota (10 µL) de la dilución de esporas. Por capilaridad la solución llenó la cámara de Neubauer. Se colocó la cámara de Neubauer en el microscopio y con el objetivo 10x se visualizó el cuadrículado de la cámara. Se pudieron ver las esporas muy pequeñas por lo que se cambió al objetivo 40x para realizar el conteo adecuadamente.

La cámara de Neubauer tiene varias cuadrículas en el centro tiene un cuadrículado formado por 25 cuadros, cada uno de estos cuadros tiene a su vez 16 cuadros chicos para llevar a cabo el conteo de esporas

Cámara de Neubauer para conteo de esporas.



Anexo D: Curva patrón para cuantificación de proteínas por Bradford

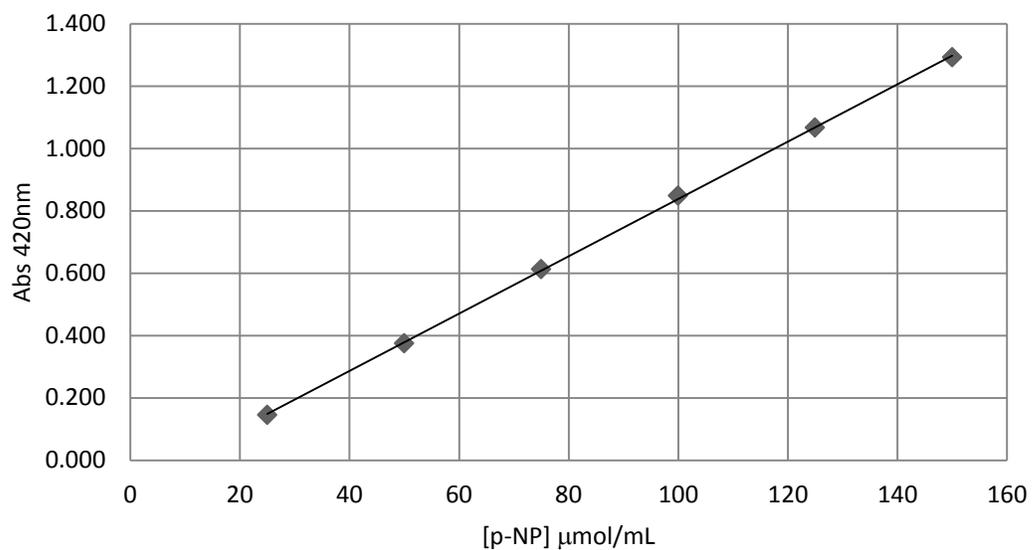


Curva	Fórmula de la curva	A	B	Coefficiente de correlación
Bradford (BSA)	$Y=A*X+B$	0.0454	-0.0158	0.998

*Realizada en el espectrofotómetro Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek).

Anexo E: Curva patrón de p-NP para medición de actividad cuantitativa

Curva patrón p-NP



Curva	Fórmula de la curva	A	B	Coefficiente de correlación
p-NP	$Y=A*X+B$	0.0092	-0.0816	0.999

Anexo F: Mini PrepCell

La cámara de elución consiste en un disco delgado de polietileno denominado “frit”. Una membrana de diálisis debajo del frit de elución, atrapa las proteínas dentro de la cámara. El buffer de elución entra a la cámara rodeando el perímetro de una junta especialmente diseñada llamada (“gasket”). El diseño especial de esta junta o goma resulta en un flujo homogéneo del buffer en el frit de elución. El buffer es direccionado radialmente hacia el tubo de elución localizado en el centro del sistema de enfriamiento (“cooling core”). Las proteínas purificadas son dirigidas hacia el tubo de colección de elución en el centro del sistema de enfriamiento por una bomba peristáltica. La bomba peristáltica dirige las proteínas separadas a través detector de UV (opcional) hacia un colector de fracciones.

Las temperaturas de las superficies inteARN y exteARN del gel son igualadas por el bombeo continuo del buffer de electroforesis colocado en la parte inferior del equipo a través del sistema central de enfriamiento mediante una bomba de recirculación.

Los accesorios requeridos para el funcionamiento del sistema son: 1) Fuente de poder (500 V), 2) Bomba peristáltica (bomba de elución), 3) Colector de fracciones y 4) Monitor de UV (opcional).

Los componentes principales del sistema Mini Prep Cell son:

- Cámaras de buffer superior e inferior
- Ensamble del tubo para el gel
- Soporte de elución
- Ensamble de colección del buffer de elución
- Estante de preparación del gel (“casting stand”)

En la figura se muestran los componentes del equipo Mini Prep Cell.

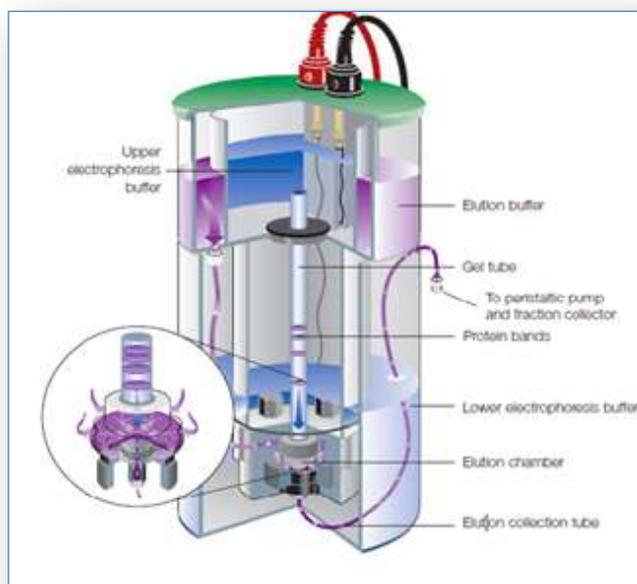


Figura .Mini Prep Cell

El tamaño de la muestra que se cargara en el Prep Cell modelo 491 y Mini Prep Cell se determinara en base a las siguientes especificaciones mostradas en la tabla.

Tabla. Especificaciones Mini Prep Cell

	Mini Prep Cell	Prep Cell modelo 491
Capacidad de la muestra cargada	0.5-1 mg	1-500 mg
Volumen de la muestra	50-500 μ l	500 μ l a 15 ml
Dimensiones (diámetro x H)	5 x 11"	7.5 x 14"
Límite del voltaje	500 V	500 V
Límite de la corriente	10 mA	40 mA
Límite de la potencia	5 W	20 W
Velocidad del caudal del buffer de elución	100 μ l/min	1ml/min

Anexo F: Prueba estadística t de Student para dos muestras independientes de idéntico tamaño

Cuando las muestras son de idéntico tamaño ($N = N$) la fórmula general queda muy simplificada porque los denominadores son idénticos:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| - 0}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2 - \sigma_2^2}{N - 1}}}$$

En este caso $N_1 = N_2 = N$, que es el número de sujetos en cada grupo y los grados de libertad son como en los casos anteriores: $N_1 + N_2 - 2$.

Esta fórmula es válida tanto para muestras grandes como pequeñas; con muestras pequeñas se consultan las tablas de la t de Student.

En el caso de la prueba de estabilidad frente a solventes, se tuvieron cuatro repeticiones para cada concentración. Los valores promedio y la DS para cada solvente; así como los valores t calculados se enlistan a continuación.

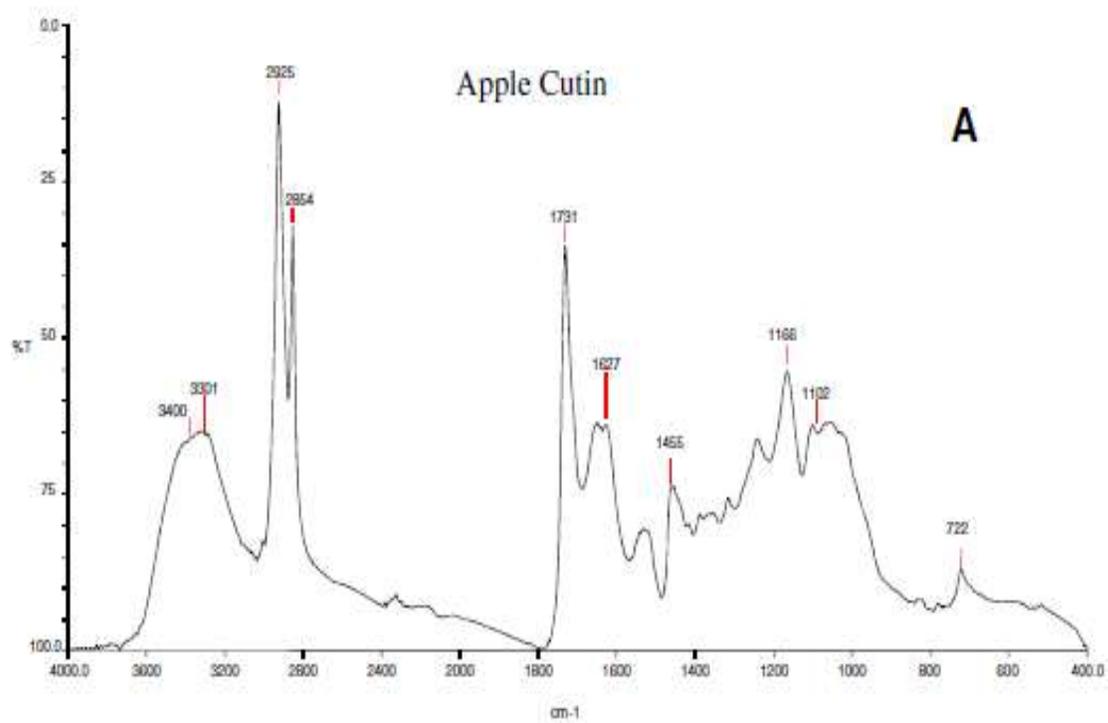
*Se usó una t de Student de 2.45 que corresponde a 6 grados de libertad y 95% de nivel de confianza.

Tabla F: Prueba t de Student para las 2 concentraciones de solvente ensayadas. El subíndice 1 corresponde a la concentración de 30% y el 2 a la concentración de 50%.

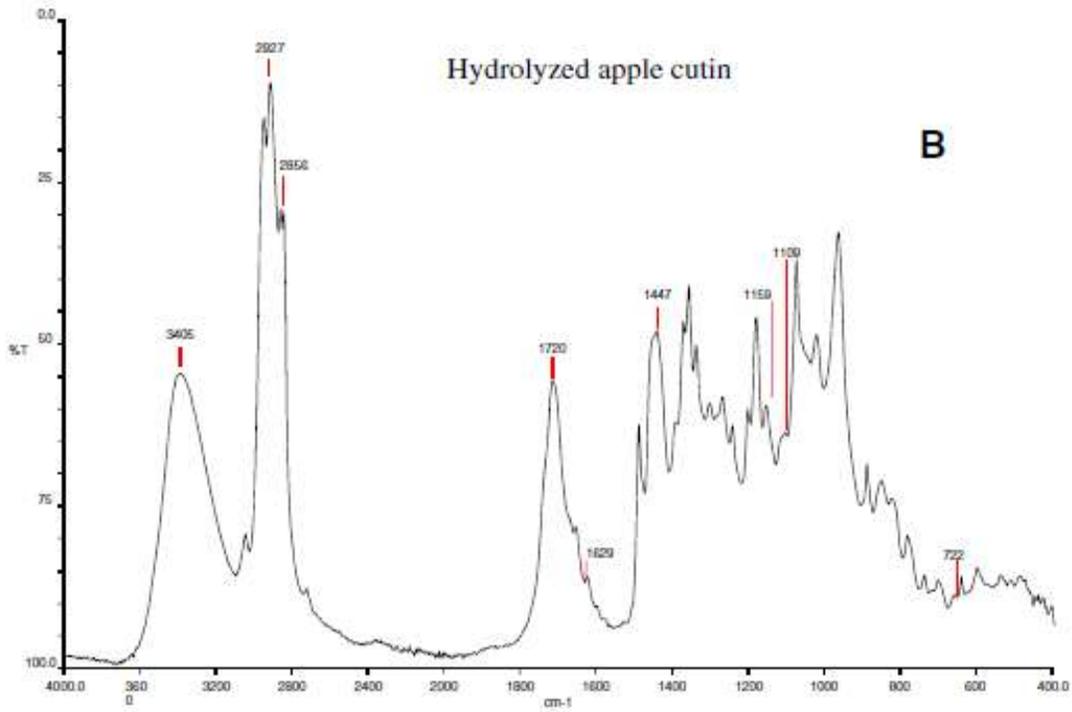
Solvente	x_1	σ_1	x_2	σ_2	t Student	t tablas	Diferencia
Acetona	44.287	4.997	39.847	0.358	1.535	2.45	No
Etanol	45.175	3.902	43.520	1.036	0.710	2.45	No
Hexano	53.008	1.770	53.815	2.569	0.448	2.45	No
isopropanol	45.620	3.913	43.742	3.881	0.590	2.45	No
DMSO	52.927	4.168	41.300	1.649	4.493	2.45	Si

*Se usó una t de Student de 2.45 que corresponde a 6 grados de libertad y 95% de nivel de confianza.

Anexo G: Espectro de IR del ensayo cutinolítico



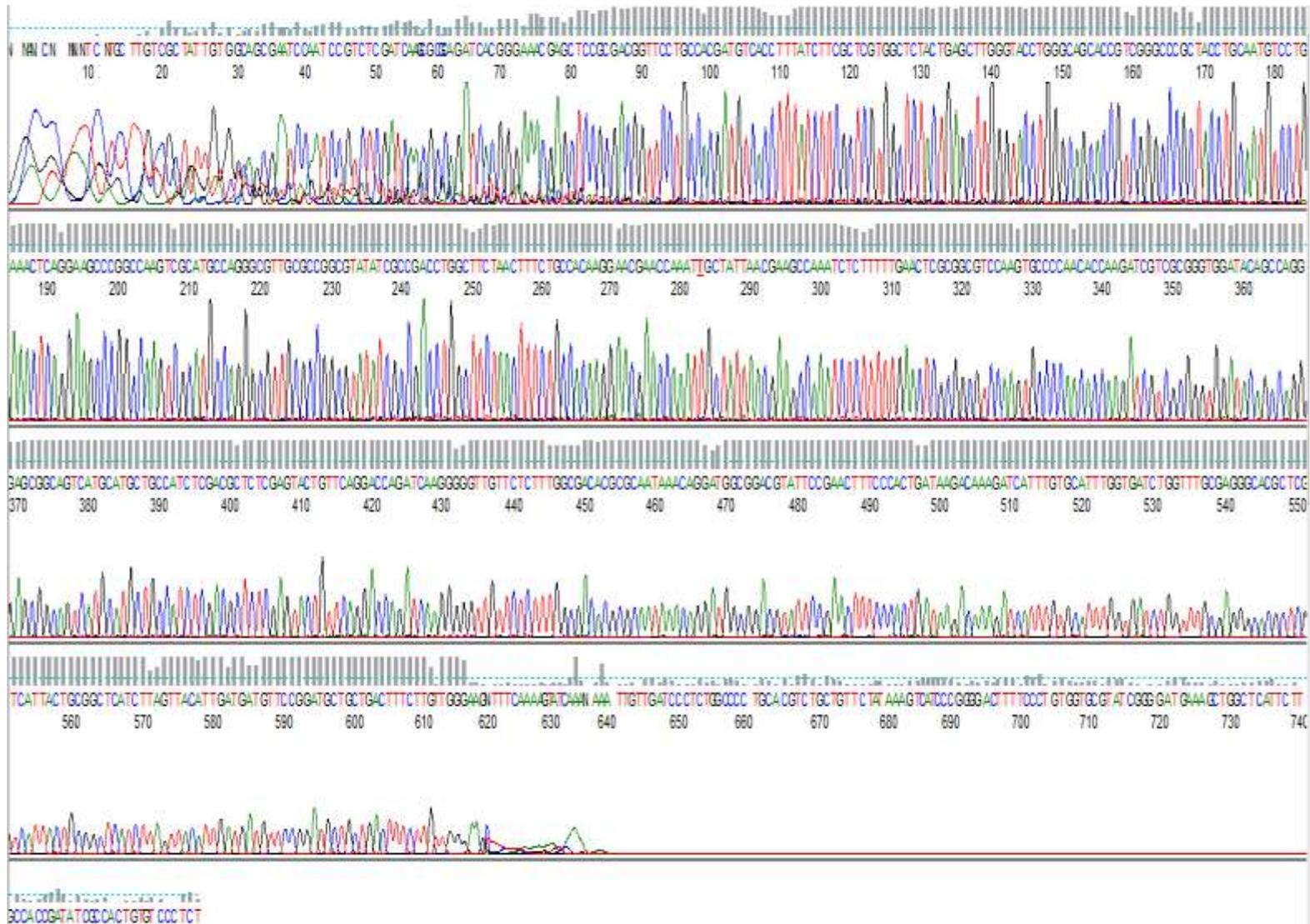
Espectro de IR para la cutina

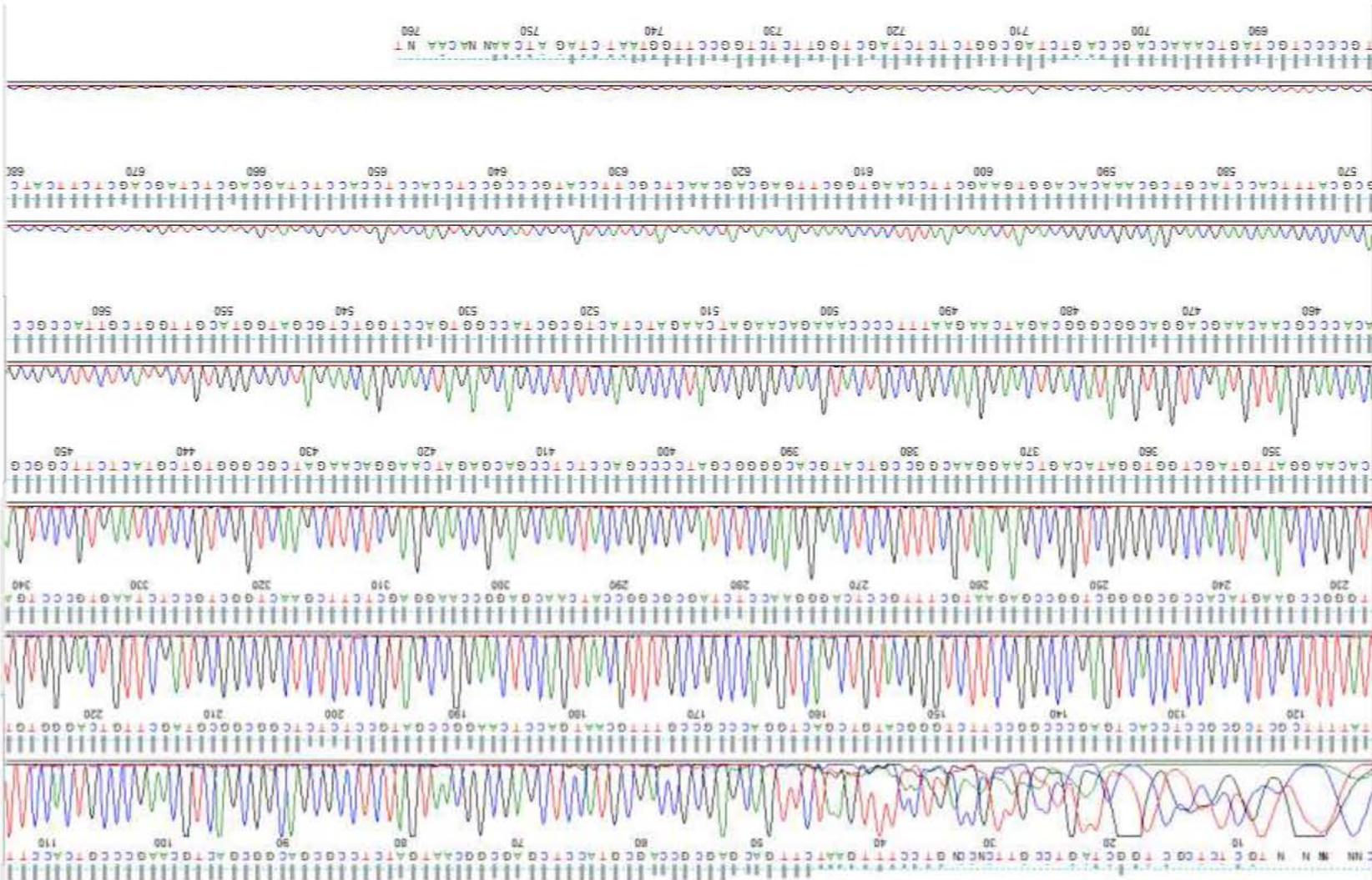


Espectro de IR para la hidrólisis de cutina

Anexo H: Secuenciación de los genes de *A. nidulans*

a) Secuencia madura del gen AN5309 (ANCUT1)





b) Secuencia madura del gen AN7541 (ANCUT2)