



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRODUCCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE UNA CUTINASA DE
Aspergillus nidulans PW1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

I.B.Q. KATIA LUCÍA ESQUEDA DOMÍNGUEZ

Tutor:

DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA



MÉXICO, D. F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

Jurado asignado

Presidente: Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Vocal: Dr. Manuel Jiménez Estrada

Vocal: Dr. Jesús Aguirre Linares

Vocal: Dr. Miquel Gimeno Seco

Secretario: Dra. Amelia Farrés González-Saravia

Este trabajo se realizó de manera conjunta en los laboratorios 321 y 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología del Edificio "E" de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Arturo Navarro Ocaña y la Dra. Amelia Farrés González-Saravia.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero de CONACyT (beca 311607) y de los proyectos PAPIIT-UNAM IN223611, PAPIIT-UNAM IN231311 y CONACyT 153500.

Asesor:

Dr. Arturo Navarro Ocaña

Sustentante:

Katia Lucía Esqueda Domínguez

AGRADECIMIENTOS

- ◆ Al Dr. Arturo Navarro Ocaña por la oportunidad de ingresar a su grupo de trabajo y por sus aportaciones durante mi formación académica.

- ◆ A la Dra. Amelia Farrés por permitirme incorporar a su grupo de trabajo y darme la oportunidad de trabajar en esta línea de investigación, la cual me ha brindado varias satisfacciones y de la cual he aprendido muchísimo. De igual manera, le agradezco infinitamente su gran contribución a mi siguiente etapa de desarrollo profesional.

- ◆ A la Dra. Carolina Peña Montes y a la M. en C. L. Denise Castro Ochoa por su asistencia técnica y académica en diferentes aspectos del laboratorio y del trabajo de investigación, y por su eterna paciencia para ayudarme a resolver mis miles de dudas.

- ◆ A los miembros de mi Comité Tutoral, Dr. Edmundo Castillo y Dr. Guillermo Aguilar, por sus valiosas aportaciones durante el desarrollo de este trabajo, y a los miembros de mi Jurado por el tiempo dedicado a la revisión del mismo y sus observaciones y sugerencias que contribuyeron a enriquecerlo.

- ◆ Al Dr. César Batista de la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología, UNAM, por el servicio de secuenciación de péptidos que permitió identificar a la enzima de estudio.

- ◆ A la Dra. Hilda Calderón por su asistencia técnica en los ensayos por HPLC y por dedicarme un poco de su tiempo para explicarme el funcionamiento del mismo.

- ◆ Al Dr. Francisco Ruiz Terán por sus enseñanzas y consejos dentro y fuera del laboratorio, por escucharme en mis momentos críticos y sobre todo ¡por todas las buenas pláticas que tuvimos!

-
- ◆ A mis compañeros del laboratorio 321 por ayudarme a acoplar a un nuevo ambiente de trabajo y a mis compañeros del laboratorio 312 por aceptarme como una más de los suyos y brindarme la confianza de poder recurrir a ustedes para cualquier duda o problema del laboratorio. Fue muy grato poder trabajar en su grupo.
 - ◆ A Lau, por ser una excelente compañera de batalla y compartir los sinsabores y alegrías que nos proporcionó *A. nidulans* y su cutinasa.
 - ◆ A mi 'hermanito' Dave, porque sin ti ¡la vida en D.F. simplemente no habría sido igual! Todas las aventuras que tuvimos no las cambio por nada. Siempre supe que podía contar contigo para cualquier ocurrencia o dificultad que tuviera y siempre supiste cómo sacarme una sonrisa o plantarme los pies en la tierra cuando lo necesité. Has estado presente en las buenas, en las malas y en las feas y sé que siempre lo estarás.
 - ◆ A Fer, porque siempre pude expresarte mis ilusiones y frustraciones de esta etapa sin temor alguno. Me demostraste lo que es apoyo incondicional y no puedo numerar todos los apuros de los que me sacaste. Después de todo lo vivido juntos, aún con sus altibajos, no puedo más que agradecerte tu sincera amistad.
 - ◆ A los jarochilangos: Dama, Andy, Fher, Xto y Esteban, por todos los buenos momentos que pasamos y por apoyarnos mutuamente en esta experiencia que en cierta manera atravesamos juntos.
 - ◆ A Cui, porque llegaste para acompañarme y guiarme a través de tanto... You are my light at the end of the tunnel.

DEDICATORIA

A mis padres, Arcelia y Valentín, por impulsarme a ser una mejor persona cada día. Cada una de sus palabras, consejos, y hasta regaños, han forjado la persona que soy actualmente. Son el pilar de apoyo más grande que tengo y sin ustedes esta etapa de mi vida no habría podido realizarse. Siempre han sabido darme las palabras de aliento necesarias para levantarme cuando siento que ya no puedo más. Ustedes han sido y siempre serán mi principal motivación para salir adelante.

A mis hermanos, Valentín y Aldo, porque han estado conmigo en todos mis éxitos y fracasos y porque sé que estarán a mi lado frente a cualquier adversidad en la vida. Son quienes mejor entienden mi mundo, con quienes puedo olvidarme un rato de las penas y reírme como niña chiquita. Los respeto y los quiero mucho.

A Yoli por abrirme las puertas de su casa y por hacerme sentir parte de su familia. No tengo palabras para expresar mi agradecimiento por todo el inmenso apoyo que me brindaste y todas las atenciones que tuviste conmigo. Te tocó oír cada risa y ver cada lágrima, compartir mis días buenos y aguantar mis días malos. Fuiste mi mamá, mi mejor amiga y mi confidente. Me siento muy afortunada por haberte conocido...creo que alguien te puso en mi camino por una razón. Siempre te recordaré con mucho cariño.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Hidrolasas que actúan sobre ésteres de ácidos carboxílicos: lipasas, carboxilesterasas y cutinasas	4
2.1.1 Mecanismo de acción	5
2.2 Generalidades sobre cutinasas	7
2.2.1 Estructura general	7
2.2.2 Reacciones catalizadas	8
2.2.3 Cutinasa como biocatalizador	10
2.2.4 Producción, purificación y caracterización de cutinasas	12
2.2.4.1 Cutícula como inductor de cutinasas en <i>A. nidulans</i>	16
2.2.5 Aplicaciones de cutinasas	18
2.3 Género <i>Aspergillus</i>	20
2.3.1 <i>Aspergillus nidulans</i>	22
2.3.2 Cutinasas en genoma de <i>A. nidulans</i>	22
2.4 Reacciones de lipofilización	23
2.4.1 Compuestos fenólicos	24
2.4.1.1 Antocianinas	24
2.4.1.2 Ácidos hidroxicinámicos	25
2.4.2 Esterificación de compuestos fenólicos	26
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos específicos	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1 Estrategia experimental	28
5.2 Microorganismo	29

5.3 Obtención de cutícula de manzana	29
5.4 Reactivación de <i>A. nidulans</i> PW1 y cosecha de esporas	29
5.5 Preparación e inoculación de medio de cultivo	29
5.5.1 Medio optimizado	31
5.6 Evaluación de actividad enzimática y de proteína	31
5.6.1 Determinación de actividad enzimática	31
5.6.2 Medición de proteína	31
5.7 Preparación de zimogramas y perfil de proteínas	32
5.7.1 Electroforesis	32
5.7.2 Tinción con plata	32
5.7.3 Tinción con azul de Coomassie	32
5.7.4 Zimograma	32
5.8 Concentración de extracto crudo	33
5.9 Liofilización	33
5.10 Identificación de la enzima	33
5.10.1 Metodología para identificación por espectrometría de masas	33
5.11 Caracterización del extracto	34
5.11.1 pH de actividad	34
5.11.2 Estabilidad a pH	34
5.11.3 Temperatura de reacción	34
5.11.4 Estabilidad a temperatura	34
5.11.5 Especificidad de sustrato	35
5.11.6 Estabilidad en solventes	35
5.11.7 Ensayo cutinolítico	35
5.12 Reacciones de lipofilización	37
5.12.1 Transesterificación de antocianina	37
5.12.2 Transesterificación de ácido hidroxicinámico	38
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1 Producción de la enzima	40
6.1.1 Obtención de cutícula	40
6.1.2 Conteo de esporas	40
6.1.3 Cinética de producción enzimática	40
6.1.4 Adición de fuente de carbono: glicerol	42

6.1.5 Efecto de la fuente de carbono y concentración sobre la producción de cutinasas	45
6.2 Identificación de la enzima	46
6.2.1 Secuenciación y análisis bioinformático	46
6.2.2 Comparación de secuencias de cutinasas	49
6.2.3 Estructura secundaria de AN5309	52
6.3 Caracterización del extracto enzimático	54
6.3.1 pH óptimo de reacción y estabilidad a pH	54
6.3.2 Temperatura de reacción y estabilidad térmica	55
6.3.3 Especificidad de sustrato	56
6.3.4 Estabilidad en solventes	57
6.3.5 Ensayo cutinolítico	58
6.2.4.1 Hidrólisis de cutina	58
6.2.4.2 Hidrólisis de ricinoleato de propilo	60
6.4 Reacciones de lipofilización	64
6.4.1 Transesterificación de cianidina-3-glucósido	64
6.4.2 Transesterificación de cumarato de metilo con butanol	65
7. CONCLUSIONES	68
8. PERSPECTIVAS	70
9. REFERENCIAS	71
ANEXOS	83
ANEXO A: Curva patrón de Bradford para cuantificar la concentración de proteína	83
ANEXO B: Curva patrón de pNFL para la determinación de actividad esterasa	84
ANEXO C: Espectro infrarrojo de cutina pura	85
ANEXO D: Espectro ESI-MS de ricinoleato de propilo (PRO)	86
ANEXO E: Cromatograma de estándar de cianidina-3-glucósido (Cya-3-glu)	87
ANEXO F: Espectro ESI-MS de cumarato de metilo (MCUM)	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Reacciones catalizadas por cutinasas en diferentes preparaciones enzimáticas	11
Tabla 2	Microorganismos productores de cutinasa	13
Tabla 3	Caracterización bioquímica de cutinasas de bacterias y hongos	15
Tabla 4	Principales monómeros de cutina de manzana (var. Golden Delicious)	17
Tabla 5	Aplicaciones de cutinasas	19
Tabla 6	Enzimas y metabolitos de <i>Aspergillus</i> con importancia comercial	21
Tabla 7	Cutinasas en genoma de <i>A. nidulans</i> FGSC A4	23
Tabla 8	Composición de medio mínimo para <i>A. nidulans</i> PW1	29
Tabla 9	Composición de solución de sales 20x	30
Tabla 10	Composición de solución de elementos traza 100x	30
Tabla 11	Variación de la fuente de carbono en medio mínimo	31
Tabla 12	Composición de aminoácidos de cutinasa AN5309	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Plegamiento de hidrolasas α/β	4
Figura 2	Mecanismo catalítico de las serín hidrolasas	6
Figura 3	Cutinasa de <i>Fusarium solani pisi</i>	8
Figura 4	Reacciones catalizadas por cutinasa	9
Figura 5	Cutícula y cutina	16
Figura 6	Compuestos fenólicos	25
Figura 7	Hidrólisis de cutina	36
Figura 8	Hidrólisis de propilricinoleato	37
Figura 9	Reacciones de lipofilización de compuestos fenólicos	39
Figura 10	Cinética de producción enzimática con cutícula de manzana	42
Figura 11	Efecto del glicerol como fuente de carbono adicional	44
Figura 12	Actividad específica con diferentes fuentes de carbono y concentración	45
Figura 13	Estructura primaria para la cutinasa AN5309	46
Figura 14	Localización del gen de la cutinasa AN5309 en el genoma de <i>A. nidulans</i>	47
Figura 15	Secuencias de cutinasas de <i>Aspergillus</i> y de <i>F. solani</i>	50
Figura 16	Secuencias de cutinasas en el genoma de <i>A. nidulans</i> FGSC A4	51
Figura 17	Estructuras secundarias hipotéticas de la proteína AN5309	53
Figura 18	Modelo de la estructura tridimensional de la cutinasa AN5309	53
Figura 19	Efecto del pH sobre la actividad de cutinasa en extracto crudo	54
Figura 20	Efecto de la temperatura sobre la actividad de cutinasa en extracto crudo	55
Figura 21	Especificidad de sustrato del extracto con la AN5309	56
Figura 22	Estabilidad en solventes del extracto con la AN5309	57
Figura 23	Cromatografía en capa fina de los productos de reacción de la hidrólisis de cutina de manzana	59
Figura 24	Espectro infrarrojo de la reacción de hidrólisis de cutina de manzana	59
Figura 25	Cromatografía en capa fina de los productos de reacción de la hidrólisis del ricinoleato de propilo	61
Figura 26	Espectros de ESI-MS de la hidrólisis de ricinoleato de propilo	63
Figura 27	Reacción de transesterificación de la cianidina-3-glucósido	64
Figura 28	Cromatograma de la reacción de transesterificación de la Cya-3-glu con el extracto liofilizado con la cutinasa	65



Figura 29	Cromatografía en capa fina de los productos de reacción de la transesterificación de cumarato de metilo a cumarato de butilo	66
Figura 30	Espectros de ESI-MS de la reacción de transesterificación de cumarato de metilo a cumarato de butilo	67

ABREVIATURAS

α -NA	a-naftil acetato
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
aa	Aminoácidos
AcRic	Ácido ricinoleico
AH	Ácidos hidroxicinámicos
BSA	Seroalbúmina bovina
BCUM	Cumarato de butilo
CAL-B	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>
CCF	Cromatografía por capa fina
Cut	Cutinasa
Cya-3-glu	Cianidina-3-glucósido
ESI-MS	Espectrometría de masas de ionización por electrospray
IR	Infrarrojo
kDa	kiloDalton
[M]	Ion molecular
MCUM	Cumarato de metilo
Mpb	Mega pares de bases
MPM	Marcador de peso molecular
ORF	“Open Reading Frame”, marco de lectura abierto
PM	Peso molecular
<i>p</i> NF	<i>para</i> -nitrofenol
<i>p</i> NFL	<i>para</i> -nitrofenil laurato
PRO	Ricinoleato de propilo
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
U	Unidad de actividad enzimática equivalente a la liberación de 1 μ mol de <i>p</i> -nitrofenol por minuto a 37°C
U/mg	Actividad específica, unidad de actividad enzimática por mg de proteína

RESUMEN

Las enzimas son moléculas orgánicas que catalizan reacciones químicas en los seres vivos, de los que se pueden extraer y utilizar en industrias como la de alimentos, farmacéutica, de cosméticos, de detergentes y de químicos finos, para la obtención de productos de mayor pureza o eficiencia o para utilizar un método de producción más económico o 'limpio'. La mayoría de las enzimas empleadas en la industria provienen de microorganismos y catalizan reacciones de hidrolasas tales como amilasas, proteasas, pectinasas y lipasas. Los hongos del género *Aspergillus* se utilizan en la industria para producir una variedad de enzimas hidrolíticas que en la naturaleza les son necesarias para la degradación de compuestos y obtención de nutrientes. Entre estas enzimas se encuentran las proteasas, las esterasas y las cutinasas, las cuales se secretan en función del tipo de inductor presente.

En este trabajo se presentan resultados sobre la producción y caracterización de una de las cuatro cutinasas secretadas por el hongo *Aspergillus nidulans*. Estudios previos en el grupo de trabajo demostraron que la cutina de manzana es un buen inductor de cutinasas –de 21 y 29 kDa, esta última ya caracterizada-. Sin embargo, la cutina es un inductor costoso y de difícil obtención, por lo que se estudió la producción de este tipo de enzimas empleando cutícula de manzana.

En cutícula como única fuente de carbono, se indujeron las dos cutinasas obtenidas con cutina. En otras fuentes de carbono, la adición de glicerol al 0.5% resultó la más adecuada para inducir la enzima de 21 kDa. Por el contrario, la presencia de glucosa en el medio reprimió la producción de ambas cutinasas. Las condiciones óptimas de producción se establecieron en dos días de fermentación a 300 rpm, 37°C, 4 g de cutícula/L de medio y glicerol al 0.5%.

A partir de un extracto crudo concentrado se tomó una muestra para obtener el perfil de proteínas en geles desnaturalizantes, se recortó la banda de interés y se identificó la proteína por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Los péptidos identificados permitieron demostrar, con un 65% de cobertura de la secuencia, que la enzima corresponde a la cutinasa hipotética AN5309 reportada en el genoma de *Aspergillus nidulans*.

Una vez identificada la enzima se realizaron pruebas de caracterización del extracto crudo concentrado con la cutinasa AN5309 y ensayos cutinolíticos. El extracto mostró mayor eficiencia y estabilidad a pH alcalino, lo que concuerda con lo reportado para otras cutinasas fúngicas. El rango de temperatura en el que se observó la mayor actividad en las condiciones de ensayo evaluadas fue de 30-40°C, por lo que se puede decir que es una enzima mesófila, aunque se observó que a 50°C retuvo hasta 80% de su actividad inicial, por lo que demostró buena termoestabilidad. El extracto enzimático mostró preferencia por sustratos de cadena media, de 8 a 12 carbonos, a pesar de que estas enzimas se reconocen por actuar naturalmente sobre un sustrato de cadena más larga. Además, demostró ser parcialmente estable en una mezcla de etanol:glicerol (50:50), en la cual retuvo hasta 65% de su actividad tras cuatro días de

incubación. El extracto con la enzima cutinolítica no hidrolizó la cutina, un sustrato que se cataloga como natural para este tipo de enzimas. Sin embargo, degradó un sustrato análogo de menor tamaño, el ricinoleato de propilo.

Por último se utilizó el extracto crudo concentrado y liofilizado para aplicarlo en dos reacciones de biocatálisis, con el fin de obtener dos productos más liposolubles. La primera fue la transesterificación de un colorante natural, la cianidina-3-glucósido. La segunda fue la transesterificación de un antioxidante derivado del ácido cinámico, el cumarato de metilo. Bajo las condiciones ensayadas, la antocianina se degradó rápidamente y no se alcanzó a obtener un producto esterificado. Esto podría deberse al efecto de algún componente del extracto crudo liofilizado, por lo que en pruebas futuras se sugiere utilizar una muestra enzimática más pura. Por otro lado, el extracto fue capaz de llevar a cabo la transesterificación del cumarato de metilo en cumarato de butilo, por lo que esta enzima puede representar una opción alterna a los biocatalizadores comerciales, para obtener antioxidantes de mayor liposolubilidad.

1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas son proteínas producidas por todos los organismos vivos que aceleran las reacciones químicas de manera selectiva como parte de procesos esenciales como la digestión, respiración y metabolismo, es decir, son catalizadores biológicos altamente específicos. Los catalizadores son moléculas que reducen la magnitud de la barrera energética que se requiere superar para que una sustancia se pueda transformar químicamente en otra, sin que éste se consuma ni se altere durante la reacción. La biocatálisis se refiere al uso de enzimas como catalizadores que sean capaces de actuar bajo las condiciones de reacción de los procesos industriales (Illanes, 2008); esta área ha obtenido gran atención en años recientes como una herramienta biodegradable y eficaz en la preparación de productos naturales, farmacéuticos, químicos finos e ingredientes alimenticios. La alta selectividad y condiciones de reacción suaves que se asocian con las transformaciones enzimáticas han hecho de este método una alternativa atractiva en la síntesis de compuestos bioactivos que frecuentemente son difíciles de obtener por la vía química (Vulfson *et al.*, 2001). En la rama de la biocatálisis existen tres fuentes principales de enzimas que se emplean en diversas industrias y son: las animales, vegetales y microbianas, donde el grupo más grande de enzimas comerciales se producen por fermentaciones microbianas, y dentro de este sector, las fuentes más importantes son las bacterianas, las fúngicas y las levaduras (Bennett, 2010). Los hongos filamentosos son particularmente importantes debido a su fácil manejo de cultivo y por la variedad de enzimas que son capaces de producir, entre las que se encuentran enzimas para degradar las paredes celulares vegetales, como las celulasas, pectinasas, cutinasas y glicosidasas, degradar almidones (amilasas), lípidos (lipasas) y proteínas (peptidasas y proteasas). Esto se deriva de su diversidad metabólica que les permite crecer sobre un gran número de sustratos y bajo una amplia variedad de condiciones ambientales (MacCabe *et al.*, 2002).

En esta misma línea, *A. nidulans* es un hongo filamentosos saprófito que se utiliza como sistema modelo de la genética eucariota; a pesar de que no se utiliza industrialmente, es capaz de producir una gran variedad de enzimas extracelulares con aplicaciones potenciales. En el grupo de investigación se ha comprobado que la cepa de estudio, *A. nidulans* PW1, puede producir enzimas con actividad de proteasa, esterasa y cutinasa dependiendo de la fuente de carbono suministrada en el medio de cultivo. Bajo esta línea de trabajo se ha logrado producir, caracterizar y aplicar una de las cuatro cutinasas que puede secretar este hongo (Peña-Montes, 2009; Vergara-Barroso, 2010; Esquivel-Bautista, 2011; Castro-Ochoa *et al.*, 2012). En la presente investigación se buscó profundizar en el conocimiento de las cutinasas de *A. nidulans*, al buscar optimizar las condiciones de producción de una segunda cutinasa y así poder definir sus características bioquímicas y estructurales, y poder evaluar aplicaciones de interés en biocatálisis.

2. ANTECEDENTES

2.1 Hidrolasas que actúan sobre ésteres de ácidos carboxílicos: lipasas, carboxilesterasas y cutinasas

Este grupo de hidrolasas comprende enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres carboxílicos, entre las que se encuentran las carboxilesterasas no específicas (EC 3.1.1.1), las lipasas (EC 3.1.1.3) y las cutinasas (3.1.1.74), las cuales inicialmente se han diferenciado en base a su especificidad de sustrato. Una diferencia fundamental entre lipasas y carboxilesterasas es su habilidad para actuar sobre sustratos solubles. Las esterasas actúan sobre ésteres carboxílicos solubles en agua (de cadena corta) mientras que las lipasas se consideran un tipo de esterasa que actúa preferentemente sobre sustratos agregados en solución acuosa, como emulsiones, y que muestra poca actividad sobre sustratos solubles, es decir, presenta actividad en interfaces hidrofílica-hidrofóbica (Neves-Petersen *et al.*, 2001). Sin embargo, la caracterización y clasificación de estas enzimas basada únicamente en la preferencia de sustrato es un poco ambigua debido a una especificidad amplia y traslapada (Chahinian *et al.*, 2009).

Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas) catalizan, en su medio natural, la hidrólisis y la síntesis de ésteres formados a partir de glicerol y ácidos grasos de cadena larga. Estas enzimas tienen pesos moleculares (PM) que varían entre 20 y 60 kDa y poseen un patrón de plegamiento α/β , el cual consiste en una hoja β paralela central con α -hélices dispuestas en ambos lados (**Figura 1**) (Cygler y Schrag, 1997). Dependiendo de su fuente, las lipasas tienen un amplio rango de propiedades como estereoespecificidad, enantioselectividad y tolerancia a temperatura (Jaeger *et al.*, 1999).

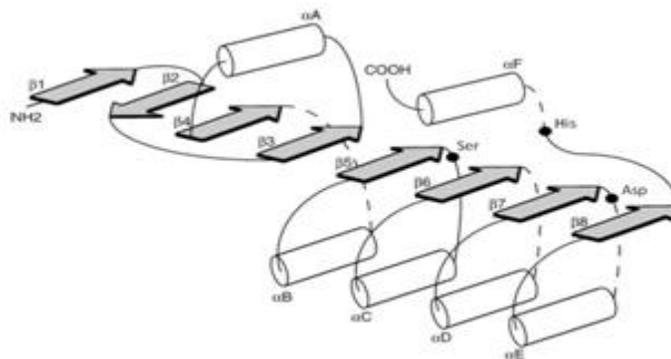


Figura 1. Plegamiento de hidrolasas α/β . Éste se compone de una hoja β central rodeada por α -hélices.

Las lipasas y carboxilesterasas ocurren ampliamente en la naturaleza, dado que son sintetizadas por plantas, animales y microorganismos. Las lipasas microbianas, especialmente aquellas provenientes de bacterias y hongos, son las más utilizadas como biocatalizadores en el área biotecnológica y en la química orgánica; ejemplo de ellas son las lipasas fúngicas de *Candida*

rugosa, *Candida antarctica* y *Rhizomucor miehei* y las lipasas bacterianas de *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes* y *Pseudomonas mendocina* (Sharma *et al.*, 2001). Algunas características que generalmente distinguen a este tipo de lipasas son su termoestabilidad y pH óptimos neutros-alcálinos (Illanes, 2008). Las lipasas son enzimas versátiles que catalizan una gama de reacciones, incluyendo hidrólisis, esterificación, alcoholólisis, acidólisis y aminólisis, por ello son de gran interés para su uso en productos y procesos industriales. Entre las varias aplicaciones que tienen estas enzimas están la hidrólisis de grasas y aceites, modificación (transesterificación) de grasas, incorporación a detergentes para la eliminación de manchas, incremento de sabores en los alimentos, análisis químicos, resolución de mezclas racémicas y síntesis orgánica, un área limitada para las carboxilesterasas ya que son menos enantioselectivas y tolerantes a solventes orgánicos (Egmond y van Bommel, 1997).

Como se ha señalado, las enzimas lipolíticas se caracterizan por una alta actividad en presencia de sustratos micelares o emulsificados. Su mecanismo de acción se ha establecido como una activación interfacial que requiere una transición conformacional de la enzima cuando se une a una interfaz lípido-agua (Jaeger *et al.*, 1999). En solución, el sitio activo está cubierto por una cadena polipeptídica llamada tapa anfipática la cual, al entrar en contacto con una interfaz hidrofóbica, pasa de una conformación ‘cerrada’ a una ‘abierta’ que expone el sitio catalítico al sustrato y al solvente y aumenta la velocidad de hidrólisis (Cygler y Schrag, 1997). Una segunda consecuencia del movimiento de la tapa es la formación de una cavidad oxianiónica en algunas lipasas, la cual proporciona un ambiente electrofílico que estabiliza la carga negativa que adquiere el sustrato tras el ataque nucleofílico de la serina catalítica (Martinez *et al.*, 1994).

La presencia de una tapa como característica general de las lipasas se ha cuestionado frecuentemente. Esta estructura se identificó en las primeras lipasas estudiadas por rayos X a principios de los años 90: la lipasa pancreática humana (Winkler *et al.*, 1990) y la lipasa de *R. miehei* (Derewenda *et al.*, 1992), y varios estudios a partir de entonces han demostrado que lipasas de diversos orígenes contienen ésta misma. Sin embargo, se ha reportado que algunas lipasas, que también hidrolizan triacilgliceroles de cadena larga pero a una velocidad menor que las lipasas clásicas, no poseen esta estructura, como es el caso de la lipasa B de *C. antarctica* (CAL-B), la cual tiene su sitio activo cubierto sólo por una pequeña asa peptídica. Es por ello que en los últimos años se ha reconocido que la presencia de una tapa no es estrictamente distintiva de las lipasas aunque sí participa en la determinación de la especificidad de sustrato (Chahinian *et al.*, 2009).

2.1.1 Mecanismo de acción

El sitio activo de las lipasas y carboxilesterasas es similar al de las serín proteasas; consiste en un residuo de serina (Ser), uno de histidina (His) y un residuo ácido que puede ser glutámico (Glu) o aspártico (Asp), y en conjunto forman la triada catalítica (Bommarius y Riebel, 2004). El residuo de His funciona como una base general, mientras que el oxígeno de la Ser es el responsable del ataque nucleofílico sobre el carbono carbonilo del enlace éster del sustrato, generando un intermediario tetraédrico acil-enzima que se estabiliza por enlaces de hidrógeno

formados con los residuos que pertenecen a la cavidad oxianiónica. El alcohol se libera y el complejo acil-enzima se hidroliza finalmente para generar un ácido graso y la enzima libre y de este modo completar un ciclo catalítico (**Figura 2**) (Neves-Petersen *et al.*, 2001).

La posición relativa de los residuos oxianiónicos está altamente conservada en la superfamilia de las hidrolasas α/β , mientras que la histidina y el residuo ácido se localizan de un lado del nucleófilo (Ser), los residuos de la cavidad oxianiónica se encuentran del lado contrario (Longhi y Cambillau, 1999).

La secuenciación de estas enzimas ha demostrado que la Ser catalítica se localiza en un pentapéptido consenso formado por residuos de -Gly-X-Ser-X-Gly (-G-X-S-X-G-), que forman una asa nucleofílica característica de las hidrolasas α/β (Ejima *et al.*, 2004). Estudios sobre carboxilesterasas revelan que la mayoría muestra un motivo conservado -G-E-S-A-G- alrededor de la Ser catalítica, aunque también se ha identificado en algunas lipasas como la de *C. rugosa* y *Geotrichum candidum* (Smith *et al.*, 1992).

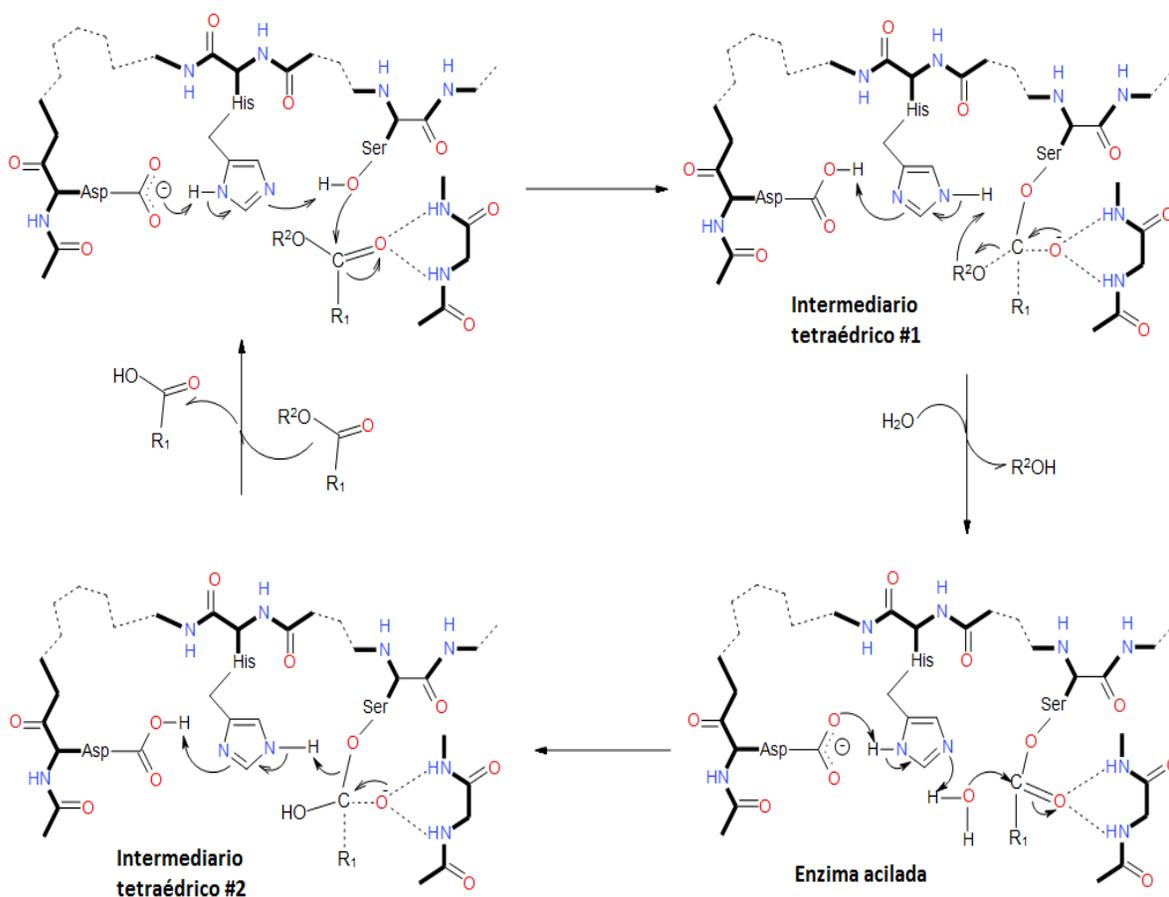


Figura 2. Mecanismo catalítico de las serín hidrolasas.

2.2 Generalidades sobre cutinasas

Las cutinasas son enzimas hidrolíticas producidas por hongos, bacterias y plantas, que degradan la cutina, un biopolímero insoluble compuesto por hidroxi y epoxi ácidos grasos de 16 y 18 carbonos unidos por enlaces éster, los cuales forman una red tridimensional rígida que constituye un componente estructural de las plantas superiores (Holloway, 1973; Deas, 1974). Además de la degradación de cutina, también pueden hidrolizar diversos ésteres sintéticos y mostrar actividad sobre triglicéridos de cadenas cortas y largas, así como realizar reacciones inversas de síntesis en medios con baja actividad de agua, por lo tanto, se pueden considerar un puente entre carboxilesterasas y lipasas debido a su amplia especificidad de sustrato (Carvalho *et al.*, 1999).

Estas enzimas son de los miembros más pequeños de las serín hidrolasas, presentan el típico plegamiento α/β y, al igual que las esterasas y lipasas, poseen una triada catalítica con un residuo de serina, un residuo de histidina y un residuo ácido, además de contar con el pentapéptido consenso (-G-X-S-X-G-) (de Barros *et al.*, 2009). Algunas características que las distinguen de las lipasas son que no exhiben 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 aun en ausencia de una interfase; y que presentan una cavidad oxianiónica preformada (Martinez *et al.*, 1992). Cabe destacar que la ausencia de reacomodos estructurales significantes en las cutinasas es una característica semejante a la observada en la CAL-B (Carvalho *et al.*, 1999).

Las cutinasas se han aislado de diferentes fuentes, principalmente de hongos. La mayoría de los estudios para elucidar sus propiedades bioquímicas y fisiológicas se han hecho sobre la cutinasa del hongo patógeno de chícharos, *Fusarium solani pisi*, y ésta se ha posicionado como el modelo general de estudio de la relación estructura-función de las cutinasas (Egmond y de Vlieg, 2000). Hasta la fecha, existen 50 estructuras de cutinasa reportadas en el Protein Data Bank (PDB); la primera estructura que se reportó corresponde a la cutinasa de *F. solani pisi* (Martinez *et al.*, 1994), a la cual se le realizaron y reportaron numerosas mutaciones y complejos enzimáticos con distintas moléculas para conocer el efecto del reemplazamiento de aminoácidos en la dinámica de la estructura y función de la proteína (Longhi *et al.*, 1996); a continuación se reportaron una proteína tipo cutinasa de *Cryptococcus* sp. (Kodama *et al.*, 2009), y las cutinasas de *Glomerella cingulata* (Nyon *et al.*, 2009) y *Aspergillus oryzae* (Liu *et al.*, 2009).

2.2.1 Estructura general

La cutinasa de *F. solani pisi* es una enzima compacta de 22 kDa de un solo dominio con dimensiones aproximadas de $45 \times 30 \times 30 \text{ \AA}^3$ (Martinez *et al.*, 1994). Tiene un centro hidrofóbico que consta de una lámina β de cinco hebras β paralelas rodeadas de cuatro α -hélices (**Figura 3a**). Posee dos puentes disulfuro que participan en la estabilización global de la molécula y en la estabilización de dos giros β consecutivos en los cuales se localiza el Asp 175 catalítico (Matak y

Moghaddam, 2009). Por lo tanto, la ruptura de los puentes afecta la actividad enzimática debido a que la triada catalítica ya no se encuentra cercana para la catálisis (Soliday y Kolattukudy, 1983). La Ser 120 catalítica es accesible al solvente y está localizada en una vuelta cerrada entre la hebra 5 y una α -hélice, al fondo de una pequeña cavidad delimitada por dos pequeñas asas (Figura 3b). Estas asas, compuestas por aminoácidos hidrofóbicos, constituyen el sitio de unión de la cutinasa. Se ha observado que la secuencia de aminoácidos que contiene la Ser catalítica (-Gly-Tyr-Ser-Gln-Gly-) concuerda con la secuencia consenso (-Gly-His(Tyr)-Ser-X-Gly-) comúnmente hallada en lipasas (Longhi y Cambillau, 1999).

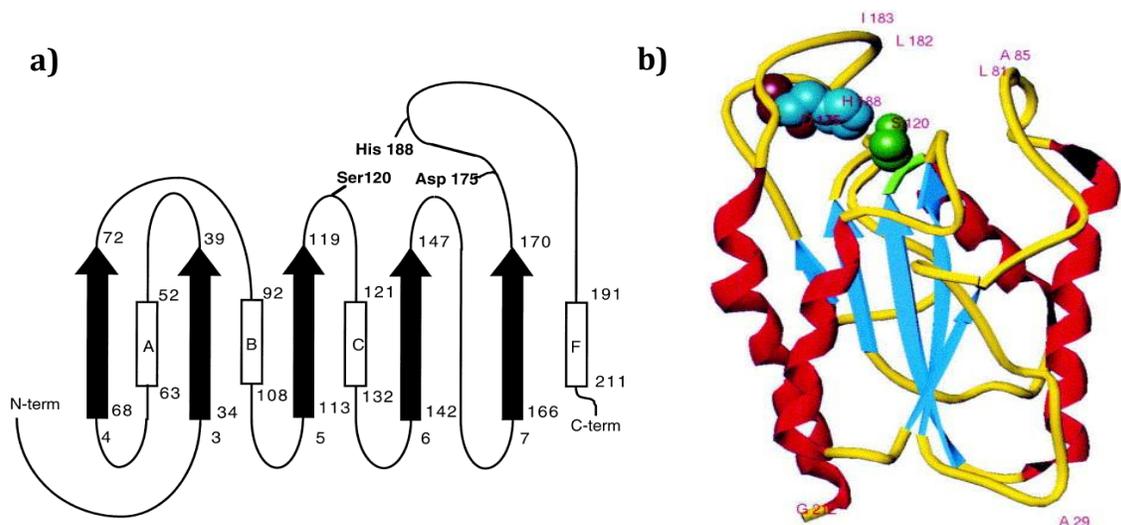
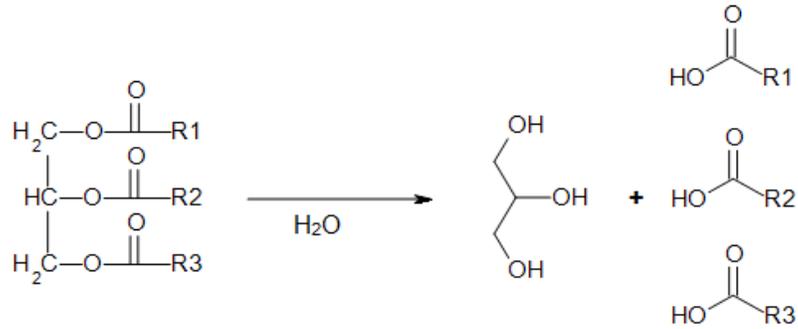
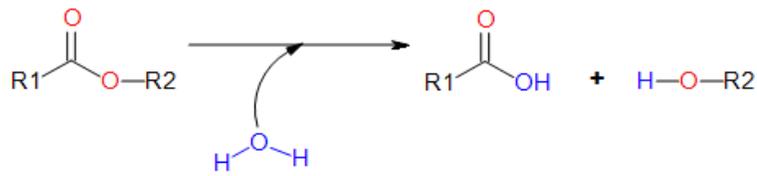


Figura 3. Cutinasa de *F. solani pisi*; a) Plegamiento α/β y localización de los residuos catalíticos Ser 120, Asp 175 e His 188; b) Estructura tridimensional del sitio activo, donde se observa la Ser catalítica al fondo de una cavidad rodeada por dos asas hidrofóbicas. (Longhi y Cambillau, 1999).

2.2.2 Reacciones catalizadas

Además de la reacción natural de hidrólisis de diversos ésteres que realizan las cutinasas, éstas pueden llevar a cabo reacciones adicionales cuando se agregan a 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 (Bommarius y Riebel, 2004) (Figura 4).

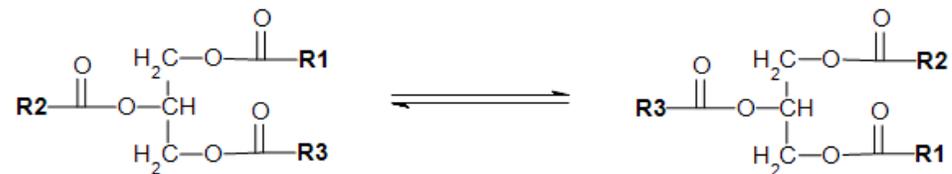
- **Hidrólisis**



- **Esterificación**



- **Interesterificación**



- **Transesterificación**

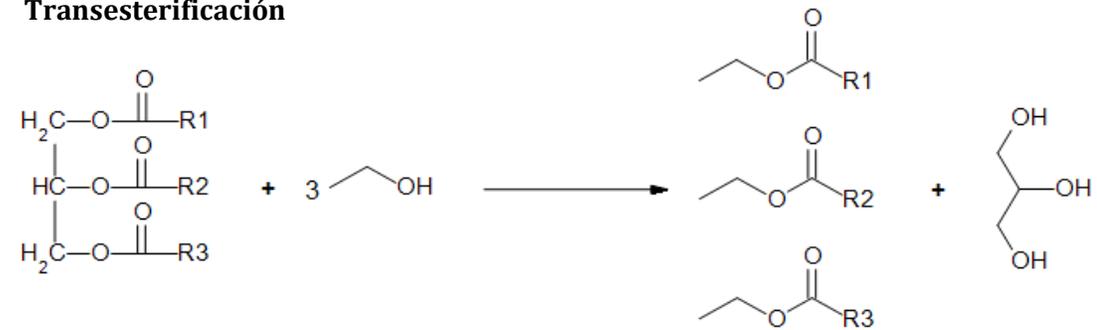


Figura 4. Reacciones catalizadas por cutinasa (Carvalho, 1998a)

2.2.3 Cutinasa como biocatalizador

Las cutinasas se han utilizado en diferentes formas en el medio de reacción, principalmente disueltas en solución acuosa, como polvo liofilizado, microencapsuladas en micelas reversas e inmovilizadas sobre soportes sólidos; entre estos últimos los más utilizados son Accurel EP-100 y Accurel MP 1000, soportes macro y microporosos de polipropileno, respectivamente (Sereti *et al.*, 1997; Vergara-Barroso, 2010), Accurel PA6, soporte macroporoso de poliamida (Gonçalves *et al.*, 1996a; Serralha *et al.*, 1998) y zeolitas de NaY (Fontes *et al.*, 1998; Gonçalves *et al.*, 1996b; Serralha *et al.*, 1998). La encapsulación en micelas reversas es un método muy eficaz que proporciona un área interfacial grande y hace posible la solubilización de sustratos hidrofóbicos e hidrofílicos y aumenta la actividad enzimática. Cutinasas microencapsuladas se han utilizado exitosamente en reacciones de hidrólisis (Melo *et al.*, 1995), esterificación (Cunnah *et al.*, 1996) y transesterificación (Papadimitriou *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 1997). El atrapamiento en gel no es un método adecuado debido al carácter altamente hidrofílico de los polímeros de alginato, lo que representa un obstáculo para la difusión de los sustratos lipofílicos (Gonçalves *et al.*, 1995). Por último, también se han utilizado fluidos supercríticos (FSC), como el CO₂, como medios alternativos a los solventes para probar reacciones con cutinasas (Sereti *et al.*, 1997). En la **tabla 1** se ejemplifican algunas reacciones realizadas con cutinasas en diferentes preparaciones enzimáticas.

Tabla 1. Reacciones catalizadas por cutinasas en diferentes preparaciones enzimáticas

		Sustratos	Preparación enzimática	Referencia	
R E A C C I Ó N	Hidrólisis	Triglicéridos	Micela reversa de AOT/isooctano	Melo <i>et al.</i> , 1995	
			Medio bifásico agua/trioleína	Flipsen <i>et al.</i> , 1996	
		Tricaprilina	Inmovilización sobre zeolitas	Gonçalves <i>et al.</i> , 1996b	
			Atrapamiento en alginato de calcio	Gonçalves <i>et al.</i> , 1995	
		Ésteres	palmitato de <i>p</i> -nitrofenilo	Inmovilización sobre dextrano	Gonçalves <i>et al.</i> , 1999
	Valerato de <i>p</i> -nitrofenilo		Micela de SDS, Tritón X-100	Pocalyko y Tallman, 1998	
	Síntesis	Esterificación	Ácido oleico + hexanol	Micela reversa de AOT/isooctano	Sebastião <i>et al.</i> , 1993
			Ácido hexanoico + hexanol	Micela reversa de CTAB	Cunnah <i>et al.</i> , 1996
			Ácido butírico + hexanol	Inmovilización sobre Accurel EP 100	Sjursnes <i>et al.</i> , 1998
			Ácido láurico + pentanol	Micela reversa de AOT/isooctano	Papadimitriou <i>et al.</i> , 1996
Trans-esterificación		Acetato de butilo + hexanol	Micela reversa de AOT/isooctano	Carvalho <i>et al.</i> , 1998b	
			Micela reversa de CTAB/isooctano	Cunnah <i>et al.</i> , 1996	
		1-feniletanol + acetato de vinilo	Inmovilización sobre zeolitas en FSC	Fontes <i>et al.</i> , 1998	

Fuente: Carvalho *et al.*, 1998a

2.2.4 Producción, purificación y caracterización de cutinasas

La producción de cutinasas se descubrió en hongos fitopatógenos que crecían en medios que únicamente contenían cutina como fuente de carbono (Trail y Koller, 1990) y posteriormente se reportó la producción en otros sistemas biológicos, como en polen de plantas, bacterias y hongos saprófitos. Algunos de los microorganismos productores se enlistan en la **tabla 2**. La producción de cutinasa está influida por el tipo y la concentración de fuente de carbono y nitrógeno, el pH del medio, la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto. Aunque la mayoría de las cutinasas microbianas se producen por cultivo sumergido, las fermentaciones en estado sólido también se han reportado (Speranza *et al.*, 2011; Castro-Ochoa *et al.*, 2010). Las cutinasas generalmente son inducidas con cutina o un hidrolizado de ésta y se inhiben si se adiciona glucosa al medio. Además se ha observado que los alcoholes primarios *n*-alifáticos de 14 o más átomos de carbono también son buenos inductores de la enzima (Lin y Kolattukudy 1980a).

Por otro lado, se han realizado estudios sobre la producción de cutinasas con otros sustratos como aceite de soya, de oliva, de girasol y de palma. Pio y Macedo (2007) observaron un alto nivel de actividad enzimática de *Fusarium oxysporum* tras 48 h de fermentación utilizando aceite de linaza como fuente de carbono. De la misma manera se han obtenido resultados favorables con el uso de cutículas de manzana, tomate y papa en la producción de cutinasas (Fett *et al.* 2000) y dado que en muchos casos éstos se consideran desechos agrícolas, representan un buen potencial como inductores de bajo costo para la producción comercial de cutinasas microbianas (Dutta *et al.*, 2009).

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 *Escherichia 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 *Aspergillus awamori* (van Gemeren *et al.*, 1998) y *Aspergillus 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, si la enzima es extracelular, o con el uso de choques osmóticos si la enzima es intracelular, a continuación se realiza una concentración selectiva por precipitación a pH ácidos, 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 *et al.* (1996) utilizando el surfactante aniónico AOT en iso octano.

Tabla 2. Microorganismos productores de cutinasa

Fuente	Género	Especie	Referencia
Hongo	<i>Fusarium</i>	<i>solani pisi</i>	Martinez <i>et al.</i> , 1992
		<i>oxysporum</i>	Speranza <i>et al.</i> , 2011
		<i>roseum</i>	Gonçalves <i>et al.</i> , 1996b
		<i>culmorum</i>	
	<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i>	Maeda <i>et al.</i> , 2005; Liu <i>et al.</i> , 2009
		<i>flavus</i>	Guo <i>et al.</i> , 1996
	<i>Monolinia</i>	<i>fructicola</i>	Wang <i>et al.</i> , 2000
	<i>Glomerella</i>	<i>cingulata</i>	Nyon <i>et al.</i> , 2009; Abu Bakar <i>et al.</i> , 2005
<i>Venturia</i>	<i>inequalis</i>	Trail y Koller, 1990	
<i>Alternaria</i>	<i>brassicicola</i>	Trail y Koller, 1993	
Bacteria	<i>Thermobifida</i>	<i>fusca</i>	Chen <i>et al.</i> , 2008
	<i>Thermomonospora</i>	<i>fusca</i>	Fett <i>et al.</i> , 1999
	<i>Thermoactinomyces</i>	<i>vulgaris</i>	Fett <i>et al.</i> , 2000
	<i>Streptomyces</i>	<i>scabies</i>	Lin y Kolattukudy, 1980a
	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	Sebastian y Kolattukudy, 1988
		<i>mendocina</i>	Kim <i>et al.</i> , 2003
Polen	<i>Tropaelum</i>	<i>majus</i>	Maiti <i>et al.</i> , 1979
	<i>Brassica</i>	<i>napus</i>	Hiscock <i>et al.</i> , 1994

Fuente: Dutta *et al.*, 2009

Como se mencionó previamente, las cutinasas catalizan la ruptura de los enlaces éster de la cutina y además son capaces de hidrolizar ésteres sintéticos como ésteres de *p*-nitrofenilo con diferente largo de cadena, aunque se ha observado que en las cutinasas fúngicas ocurre una disminución en su actividad conforme se aumenta el largo de cadena. Las cutinasas fúngicas se han estudiado ampliamente, a diferencia de las de origen bacteriano, esto debido a la falta de conocimiento en cuanto a su identificación en marcos de lectura abiertos (ORFs). Los estudios se han centrado sobre todo en la cutinasa de *F. solani pisi* (Martinez *et al.*, 1992; Gonçalves *et al.*, 1997; Longhi y Cambillau, 1999; Egmond y de Vlieg, 2000; Creveld, 2001; Melo *et al.*, 2003; de Barros *et al.*, 2010) y en fechas recientes se ha comenzado a avanzar en los estudios sobre la cutinasa de *A. oryzae* (Andersen *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009). Las cutinasas fúngicas se caracterizan por ser moléculas de bajo peso molecular (20-30 kDa), son más activas a temperatura media (30-40°C) y son de naturaleza predominantemente alcalina, es decir, muestran mayor actividad hidrolítica a pH por encima de 7.0; se sabe que el pH óptimo *in vitro* está correlacionado con el sitio natural de acción del microorganismo, ya sea que actúe sobre frutos, hojas o tallos. La comparación de las características bioquímicas de las cutinasas de bacterias y hongos indica que tienen especificidades de sustrato y propiedades catalíticas similares, con la excepción de que algunas cutinasas bacterianas exhiben mayor

termoestabilidad, dependiendo del microorganismo fuente. Se les ha empezado a estudiar de manera más amplia para conocer sus potenciales aplicaciones en la industria y en la **tabla 3** se muestran las diferentes propiedades mostradas por cutinasas fúngicas y bacterianas. En cuanto a su estructura primaria y secundaria, ambos tipos de cutinasas microbianas pertenecen a las hidrolasas α/β y poseen un sitio activo inmediatamente accesible, sin embargo, las enzimas bacterianas tienen secuencias significativamente más largas y no demuestran similitudes de secuencias con las de origen fúngico. Además, la estructura de las cutinasas de hongos no contiene dos hebras β en el extremo N-terminal ni la extensión en el extremo C-terminal presente en la de bacterias. Por lo tanto, es probable que estos dos tipos de cutinasas hayan sufrido una diferenciación evolutiva y se sugiere que se clasifiquen en subfamilias de cutinasas procariotas y eucariotas (Chen *et al.*, 2008).

Tabla 3. Caracterización bioquímica de cutinasas de bacterias y hongos

Microorganismo	pH óptimo	Temp. óptima (°C)	Estabilidad a temp. (°C)	Especificidad de sustrato	PM (kDa)	Referencia
<i>Thermobifida fusca</i>	8	60	40 por 160 h 60 por 40 h	Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	29	Chen <i>et al.</i> , 2008; Chen <i>et al.</i> , 2010
<i>Thermomonospora fusca</i>	11	--	70 por 1 h	Cutícula de manzana cv. Golden Delicious	28.5	Fett <i>et al.</i> , 1999
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	11	--	60 por 1 h 70 por 0.5 h	Cutícula de tomate	--	Fett <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas putida</i>	8.5-10.5	--	--	Butirato/caprolato/ caprilato de <i>p</i> -nitrofenilo	30	Sebastian y Kolattukudy, 1988
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7.5	37	--	Caprilato de <i>p</i> -nitrofenilo	21.8	Shué <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus oryzae</i>	9	35-55	40 – 45 por 1 h	Butirato/valerato de <i>p</i> -nitrofenilo	21.6	Maeda <i>et al.</i> , 2005; Liu <i>et al.</i> , 2009
<i>Fusarium oxysporum</i>	8-9	30 - 37	30 – 40	Butirato/caprilato de <i>p</i> -nitrofenilo	23	Speranza <i>et al.</i> , 2011
<i>Fusarium solani pisi</i>	9	35 - 45	40 – 60	Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	22	Speranza <i>et al.</i> , 2011

-- : No determinado

Tabla 4. Principales monómeros de cutina de manzana (var. Golden Delicious)

Ácido graso	Monómeros totales (%)
16-hidroxihexadecanoico	2.1
9- ó 10,16-dihidroxihexadecanoico	19.7
18-hidroxi octadeca-9-enoico	2.4
18-hidroxi octadeca-9,12-dienoico	14.3
9,10-epoxi-18-hidroxi octadeca-12-enoico	22.5
9,10-epoxi-18-hidroxi octadecanoico	15.3
9,10,18-trihidroxi octadeca-12-enoico	4.3
9,10,18-trihidroxi octadecanoico	14.4
Otros	5

Fuente: Holloway, 1973

La mayoría de las cutículas caracterizadas corresponden a hojas y frutas (Kolattukudy, 1970; Deas *et al.*, 1974; Casado y Heredia, 1999; Vogg *et al.*, 2004), sobre todo la cutícula y cutina de manzana se han estudiado ampliamente (Richmond y Martin, 1959; Holloway, 1973; Croteau y Kolattukudy, 1974). La cutina de manzana, variedad Golden Delicious, se utilizó como fuente de carbono e inductor en los primeros estudios de producción de cutinasas en *F. solani pisi*, con resultados favorables (Purdy y Kolattukudy, 1975; Lin y Kolattukudy, 1980). Estudios posteriores han explorado diferentes sustratos para lograr la producción de cutinasas en hongos (Guo *et al.*, 1996) y bacterias (Sebastian y Kolattukudy, 1988; Fett *et al.*, 1999; Fett *et al.*, 2000) y han concluido que la cáscara de tomate, la cutina de manzana y la suberina de papa son buenos inductores de estas enzimas.

Estudios previos en el grupo de trabajo mostraron que la cepa de *A. nidulans* PW1 produce enzimas con actividad carboxilesterasa cuando se emplea aceite de olivo como inductor en el medio de cultivo. Entre estas enzimas se halló una proteasa con actividad hidrolítica (PrtA) de 37 kDa (Peña-Montes *et al.*, 2008), y una cutinasa de 29 kDa, la cual se identificó como cutinasa AN7541 (Castro-Ochoa *et al.*, 2012). Estudios posteriores se centraron en analizar las características estructurales de la AN7541 y en la optimización de sus condiciones de producción (Castro-Ochoa *et al.*, 2012), así como en la caracterización bioquímica (pH, temperatura, sustratos) y aplicación de la enzima libre e inmovilizada (Vergara-Barroso, 2010). Entre las fuentes de carbono ensayadas para optimizar la producción de la AN7541, Castro-Ochoa (sometido) realizó fermentaciones con cutina (extraída de cáscara de manzana) al suponerse como el sustrato natural de este tipo de enzimas. Se realizaron geles de actividad esterolítica de los extractos crudos de estas fermentaciones y se observó una sola banda, de aproximadamente 21 kDa, en lugar de la banda esperada de 29 kDa correspondiente a la AN7541. Este hallazgo derivó en la identificación preliminar de la proteína de 21 kDa por medio de la secuenciación de péptidos y se identificó como la cutinasa AN5309, reportada en el genoma de *A. nidulans*. Una vez identificada la enzima, se realizaron fermentaciones de prueba utilizando cutículas de manzana, tomate y papa para conocer si también inducían a la cutinasa de 21 kDa.

Los geles de actividad de cada uno de los extractos crudos mostraron que las tres cutículas inducen únicamente la cutinasa de 21 kDa, y los ensayos para medir actividad esterolítica mostraron que, después de la cutina de manzana, la cutícula de manzana fue la más eficiente para producir la cutinasa, seguida de la cutícula de tomate y por último la de papa (Castro-Ochoa, sometido). A partir de estas observaciones con la cutina y las cutículas, Segoviano-Reyes (2012) estudió y estableció las condiciones óptimas de producción de la cutinasa AN5309, empleando cutina de manzana como inductor. Sin embargo, debido a que el uso de cutina pura como sustrato presenta desventajas en cuanto a su costo y método de obtención, se decidió en el presente trabajo utilizar la cutícula de manzana, variedad Golden Delicious, como inductor para producir la cutinasa AN5309. La producción de cutinasas por esta vía representa una ventaja económica ya que la cutícula, al ser un residuo agrícola de las industrias de alimentos, podría resultar un sustrato de bajo costo para la producción de enzimas.

2.2.5 Aplicaciones de cutinasas

Las cutinasas han generado interés como una alternativa a enzimas ya estudiadas y disponibles comercialmente, como lo son diversas esterasas y lipasas microbianas, debido principalmente a su especificidad intermedia entre estos dos tipos de enzimas (Donelli *et al.*, 2009). Como enzimas lipolíticas, muestran propiedades de interés en algunos productos o procesos industriales, como en la síntesis de productos para el cuidado personal, en la degradación de insecticidas como el malatión (Kim *et al.*, 2005), incorporados a detergentes para la remoción de triacilglicerol (Dutta *et al.*, 2009) o a formulaciones de agroquímicos (Genencor, 1988), e incluso en la producción de biodiesel mediante reacciones de transesterificación entre triglicéridos y metanol en micelas reversas, con conversiones de hasta 75% en 24 h (Badenes *et al.*, 2010). Sin embargo, en la actualidad son pocas las cutinasas que se producen comercialmente y en ocasiones se catalogan como lipasas; como ejemplos comerciales se tienen la NOVOZYM® 51032 de Novozymes, la cual se comercializa como una lipasa (cutinasa) de *F. solani pisi* (Kotsakis y Parry, 2010), la formulación TEXAZYM EM de inoTEX Ltd (Donelli *et al.*, 2009) y un extracto crudo de cutinasa de *Pseudomonas* de InterSpex Products (Guo *et al.*, 1996). La mayoría de los estudios orientados a explorar aplicaciones se realizan con enzimas recombinantes expresadas en *S. cerevisiae* (de Barros *et al.*, 2009), *E. coli* (Badenes *et al.*, 2010) o *Pichia pastoris* (Liu *et al.*, 2009), o son producidas y purificadas en el grupo de trabajo, y en pocos casos se han empleado cutinasas comerciales para estos fines. También es importante resaltar que la variedad de cutinasas evaluadas es limitada, siendo aquella de mayor aplicación la de *F. solani pisi* por el amplio conocimiento que se tiene sobre ésta, de modo que el presente trabajo representa una novedad en cuanto a la aplicación de una cutinasa de un microorganismo poco utilizado. En la **tabla 5** se mencionan algunos de los estudios realizados sobre los diferentes usos que presentan estas enzimas.

Tabla 5. Aplicaciones de cutinasas

Aplicación	Tipo	Origen	Referencia
Producción de aromas – hexil octanoato, etil caproato	Recombinante – <i>S. cerevisiae</i>	<i>F. solani pisi</i>	de Barros <i>et al.</i> , 2011, de Barros <i>et al.</i> , 2009
Producción de biodiesel – transesterificación de aceites	Recombinante – <i>E. coli</i>	<i>F. solani pisi</i>	Badenes <i>et al.</i> , 2010
Modificación y funcionalización de materiales sintéticos (PET)	Comercial – TEXAZYM EM	<i>F. solani pisi</i>	Donelli <i>et al.</i> , 2009
Limpieza de algodón por remoción de ceras	Muestra granular no comercial – Unilever	<i>F. solani pisi</i>	Agrawal <i>et al.</i> , 2008
Síntesis de poliésteres, polimerización de lactonas	Comercial - Novozymes	<i>Humicola insolens</i>	Hunsen <i>et al.</i> , 2007
Degradación de plásticos biodegradables – policaprolactona (PCL)	Extracto puro	<i>F. solani pisi</i>	Murphy <i>et al.</i> , 1996
Síntesis de ésteres de ácidos grasos	Recombinante	<i>F. solani pisi</i>	Sebastião <i>et al.</i> , 1993
Formulación de detergentes	Comercial – NOVOZYM® 51032	<i>F. solani pisi</i>	Kotsakis y Parry, 2010
	Extracto puro	<i>P. putida</i> , <i>F. roseum</i>	Kolattukudy y Poulouse, 1988

2.3 Género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* comprende un grupo diverso de hongos filamentosos ubicuos en la naturaleza. Se aíslan comúnmente del suelo, de residuos vegetales y de ambientes aéreos encerrados. El género incluye más de 185 especies, de las cuales alrededor de 20 se han reportado como patógenos para el ser humano (Galagan *et al.*, 2005). Las especies de *Aspergillus* tienen una flexibilidad nutricional amplia dado que pueden crecer y reproducirse sobre diferentes fuentes de carbono. La diversidad de enzimas y ácidos orgánicos utilizados para obtener nutrientes se complementa con su capacidad de secretar numerosos metabolitos secundarios que se cree son importantes en el señalamiento ecológico para percibir la disponibilidad de nutrientes, el contacto con la superficie y la presencia del huésped (Goldman y Osmani, 2008).

La característica morfológica que define a este género, y de la cual deriva su nombre taxonómico, es la estructura del conidióforo en forma de aspergillum (Geiser *et al.*, 2008). Algunas especies de *Aspergillus* producen esporas sexuales y asexuales. En otras especies la forma sexual es rara mientras que en otras más no se les conoce (Tobert *et al.*, 2003). Los hongos de *Aspergillus* son fáciles de cultivar en el laboratorio tanto en medio sólido como líquido; las principales características de cultivo que se utilizan para identificar las especies son el color de la colonia, que va desde distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro, la velocidad de crecimiento y su tolerancia a la temperatura, siendo que la mayoría de las especies crecen óptimamente entre 30-40°C. Los *Aspergilli* además tienen diferentes respuestas morfológicas y de crecimiento según los nutrientes presentes en el medio (Geiser *et al.*, 2008).

Este grupo taxonómico se reconoce por su capacidad para secretar una variedad de compuestos biológicamente activos que son de alta importancia industrial, médica, farmacéutica, agrícola y científica; en la **tabla 6** se citan algunos de los compuestos más importantes producidos por especies de *Aspergillus*. En el área médica, *Aspergillus fumigatus* se destaca por ser el mayor patógeno oportunista y alérgeno que causa enfermedades como aspergilosis pulmonar en animales y humanos con sistemas inmunes comprometidos, le sigue en menor medida *Aspergillus terreus*, mientras que *Aspergillus flavus* es productor de aflatoxinas, sustancias tóxicas que contaminan alimentos y cultivos, y que en los humanos pueden provocar cáncer en el hígado (Bennett, 2010). Desde un punto de vista biotecnológico, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* se destacan como productores de diversas enzimas industriales (Godfrey y West, 1996), además de que *A. niger* se ha convertido en una fábrica biológica de ácido cítrico para las industrias de alimentos y bebidas. Por último, la lovastatina producida por *A. terreus* es uno de los medicamentos más utilizados en la actualidad para la disminución de colesterol en sangre (Tobert *et al.*, 2003).

Tabla 6. Enzimas y metabolitos de *Aspergillus* con importancia comercial

Especie	Producto metabólico	Aplicación
<i>A. niger</i>	- Ácido cítrico	* Aditivo en alimentos, fármacos y cosméticos
	- Ácido glucónico	* Aditivo en productos de limpieza de metales
	- α -galactosidasa	* Degradación de azúcares de legumbres
	- Pectinasa	* Clarificación de jugos y vinos
	- Lipasa	* Lácteos y detergentes
<i>A. oryzae</i>	- Hemicelulasa	* Panificación, gomas
	- Ácido kójico	* Antioxidante en alimentos y cosméticos
	- α -amilasa	* Panificación
	- Lactasa	* Lácteos y farmacéuticos
	- Proteasa	* Panificación, cerveza
<i>A. terreus</i>	- Glucoamilasa	* Panificación, jarabes fructosados
	- Lovastatina	* Agente reductor de colesterol
<i>A. melleus</i>	- Ácido itacónico	* Industria de papel, látex
	- Peptidasa	* Hidrolizados de proteína
<i>A. parasiticus</i>	- Micotoxinas (ocratoxina, patulina y fumigilina)	* Importancia médica
<i>A. flavus</i>	- Toxinas carcinogénicas (aflatoxinas)	* Importancia médica

Fuente: Tobert *et al.*, 2003; Goldman y Osmani, 2008; Bennett, 2010; American Laboratories Inc.

Cada vez se consideran más y nuevos usos para enzimas fúngicas en la biotecnología moderna. Los hongos tienen numerosas enzimas que pueden degradar polímeros complejos en azúcares, lípidos u otras moléculas simples que pueden ser utilizadas para combustibles o en síntesis orgánica. A pesar de que la mayoría de los estudios se han centrado sobre otros géneros, como *Trichoderma*, los hongos del género *Aspergillus* representan un potencial para hallar nuevas enzimas que puedan convertir materiales en productos útiles para la industria (Baker *et al.*, 2008).

2.3.1 *Aspergillus nidulans*

A. nidulans es un hongo filamentoso saprófito que se encuentra en el suelo y colonizando material vegetal en descomposición. Es un miembro importante del género *Aspergillus* al compartir varias de las propiedades de los demás hongos con importancia industrial y económica. También se le conoce como *Emericella nidulans* ya que puede llevar a cabo ciclos de reproducción sexual (ascoesporas) además de la forma asexual (conidias) que caracteriza a los miembros del género *Aspergillus*, y debido a esto se ha convertido en uno de los organismos modelos más importantes dentro de la genética de eucariotes (David *et al.*, 2008). Los trabajos realizados con *A. nidulans* han generado avances en el entendimiento del desarrollo sexual y asexual de los hongos, en la regulación metabólica, control del ciclo celular, función del citoesqueleto, reparación del ADN, entre otros (Galagan *et al.*, 2005).

El avance en los estudios genéticos con *Aspergillus* generó interés por secuenciar sus genomas y en 2005 la secuencia del genoma de *A. nidulans* se publicó junto con el de *A. fumigatus* y *A. oryzae*. La publicación simultánea de estos tres genomas colocó al género *Aspergillus* como líder en los estudios genómicos comparativos (Galagan *et al.*, 2005). Sin embargo, los estudios sobre la expresión de proteínas en *Aspergillus* son relativamente pocos. Se estima que sólo un 10% del proteoma se ha identificado y publicado en estudios hasta la fecha, por lo que alrededor del 90% de los ORFs se catalogan como proteínas hipotéticas (David *et al.*, 2008).

2.3.2 Cutinasas en el genoma de *A. nidulans*

La secuenciación del genoma de la cepa FGSC A4 de *A. nidulans* fue un proyecto llevado a cabo en el 2003 por el Broad Institute del Instituto Tecnológico de Massachussets y la Universidad de Harvard, como parte de la Iniciativa del Genoma Fúngico (Fungal Genome Initiative). El genoma de *A. nidulans* tiene un tamaño aproximado de 30.07 Mpb organizado en ocho cromosomas con 10,560 genes, de los cuales 60 codifican enzimas de tipo esterasa y entre éstos se han hallado cuatro genes de cutinasa, que se describen brevemente en la **tabla 7**. De estas cuatro cutinasas sólo dos se han confirmado como tal y se describen como proteínas con actividad cutinolítica, mientras que las dos restantes permanecen como cutinasas hipotéticas de las cuales todavía no hay evidencia que las defina claramente.

Tabla 7. Cutinasas en genoma de *A. nidulans* FGSC A4

Gen	Nombre	No. aa	PM teórico (kDa)	Existencia de proteína	Localización	Descripción	Referencia
AN5309	Cutinasa probable 1	213	22.4	Inferida por homología	Extracelular	Proteína no verificada	--
AN7180	Cutinasa 3	221	23.0	A nivel de transcripción	Extracelular	Proteína con actividad cutinolítica	Bauer <i>et al.</i> , 2006
AN7541	Cutinasa 2	255	26.0	A nivel de transcripción	Extracelular	Proteína con actividad cutinolítica	Bauer <i>et al.</i> , 2006
AN10346	Cutinasa hipotética	223	22.7	Predecible	Extracelular	Proteína no verificada	--

Fuentes: UniProt, Broad Institute, Aspergillus Genome Database

2.4 Reacciones de lipofilización

La lipofilización es la esterificación de un componente lipofílico, como un ácido o alcohol graso, en sustratos como azúcares, proteínas o compuestos fenólicos, para generar nuevas moléculas con un balance hidrofílico/lipofílico modificado (Figuroa-Espinoza y Villeneuve, 2005). Los compuestos fenólicos, como los flavonoides y ácidos fenólicos, se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza y poseen propiedades biológicas interesantes, ya que pueden actuar como antioxidantes, agentes quelantes, antimicrobianos o como filtros UV, y por ello se utilizan en alimentos, cosméticos y fármacos. Sin embargo, debido a su baja solubilidad en fases no acuosas, su aplicación en medios hidrofóbicos es limitada. Para mejorar sus propiedades de solubilidad, algunos autores han estudiado la modificación de sus estructuras a través de reacciones químicas y enzimáticas que implican la adición de grupos alifáticos para aumentar la hidrofobicidad de las moléculas. La esterificación química presenta la desventaja de que no es regioselectiva y puede alterar la funcionalización de los grupos hidroxilo responsables de la actividad antioxidante; por otro lado, la esterificación con enzimas es más regioselectiva y puede aumentar no sólo su solubilidad en distintos medios, sino su estabilidad y poder antioxidante (Chebil *et al.*, 2006). El uso de enzimas en medios no acuosos es un método ampliamente utilizado para obtener productos de alto valor bajo condiciones suaves de reacción y en la

actualidad existen numerosos reportes sobre la esterificación de antioxidantes utilizando enzimas como lipasas o feruloil esterasas (Tsuchiyama *et al.*, 2007; Vafiadi *et al.*, 2008).

En el grupo de investigación se han realizado trabajos relacionados a la modificación de moléculas mediante reacciones de hidrólisis y síntesis, con un particular enfoque hacia compuestos antioxidantes, con los cuales se han obtenido resultados favorables. Esquivel-Bautista (2011) reportó la producción de un antioxidante de carácter hidrofóbico, el 7-*O*-lauroilo de ácido kójico, mediante esterificación regioselectiva en tolueno utilizando la cutinasa AN7541 de *A. nidulans*. Por otro lado, Bermúdez-García (2010) logró la esterificación de dos flavonoides, rutina y naringina, con ácidos grasos de cadena media (ácido octanoico) y la transesterificación de un tercer flavonoide, quercetina, con vinil isopropilato, utilizando un extracto inmovilizado de carboxilesterasas de *Bacillus pumilus* GMA1; también se encontró que la reacción de transesterificación fue superior a la de esterificación, ya que presentó mayor % conversión del flavonoide en menor tiempo. Finalmente, Peña-Montes (2009) ensayó reacciones de desacetilación de fenoles, alcoholes alifáticos y flavonoides para recuperar la actividad antioxidante de éstos, utilizando dos esterasas, NstcI y StcI, de *A. nidulans*; los resultados mostraron que la esterasa NstcI fue más eficiente para realizar la hidrólisis de los compuestos, ya que presentó los mayores % de conversión de antioxidantes como el ácido 4-*O*-acetil-ferúlico ↔ ácido ferúlico (96%), 1,4-*O*-diacetil-2-*ter*-butil-hidroquinona ↔ *ter*-butil-hidroquinona (100%), ácido 5,1'-*O*-diacetil kójico ↔ ácido 5-*O*-acetil kójico (75%), y flavonoides como la quercetina (95%), hesperidina (100%) y catequina (100%).

2.4.1 Compuestos fenólicos

2.4.1.1 Antocianinas

Las antocianinas pertenecen a los flavonoides y constituyen un grupo de metabolitos secundarios coloridos (tonos rojos, azules y morados) sintetizados por las plantas superiores para asistir en funciones biológicas como la atracción de polinizadores y protección de los tejidos vegetales de los rayos ultravioleta (Eisbond *et al.*, 2004). La estructura base se conoce como antocianidina y las de mayor abundancia son la malvidina, petunidina, peonidina, pelargonidina, delphinidina y cianidina, siendo esta última la más común de todas. Estas moléculas por lo general se encuentran glicosiladas con azúcares como glucosa, galactosa o rutinosa (**Figura 6a**), los que, a su vez, pueden tener unidos moléculas de ácidos orgánicos alifáticos, como ácido acético, o aromáticos, como ácido cinámico y derivados de éste (Horbowicz *et al.*, 2008). La unión de carbohidratos a la antocianidina genera glicósidos estables hidrosolubles. Sin embargo, se ha comprobado que las moléculas que tienen sustituyentes acilo en los residuos de azúcar son más estables que los glicósidos frente a ciertas condiciones de procesamiento y almacenamiento, además de aumentar su liposolubilidad; esto ha aumentado el interés por estos compuestos para emplearlos en alimentos como alternativa a los colorantes sintéticos y para aumentar el contenido de antioxidantes en éstos, por lo que se pueden considerar como alimentos funcionales (Cortés *et al.*, 2005).

2.4.1.2 Ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos (AH) son una clase de polifenoles formados por un anillo aromático y un grupo alifático de tres carbonos con un ácido carboxílico en el extremo. Son derivados del ácido cinámico debido a la sustitución de grupos en el anillo aromático, que siempre presenta al menos un grupo hidroxilo. Los principales representantes son el ácido cafeico, sinápico, ferúlico y *p*-cumárico, siendo estos dos últimos los de mayor abundancia en la naturaleza (**Figura 6b**) (Ferguson *et al.*, 2005). Estos ácidos se distribuyen ampliamente en el reino vegetal y son esenciales en el metabolismo secundario de las plantas. Se encuentran en los frutos y en las paredes celulares, ya sea esterificados con otros hidroxiaácidos o en forma glicosilada con unidades de sacarosa o arabinosilanos, y participan en mecanismos de defensa y eliminación de toxinas (Bengochea *et al.*, 1995). Los AH se utilizan principalmente como antioxidantes que se incorporan a alimentos, cosméticos y fármacos para prevenir la oxidación de sustratos como las lipoproteínas de baja densidad (LBD) o “colesterol malo” (Vafiadi *et al.*, 2008).

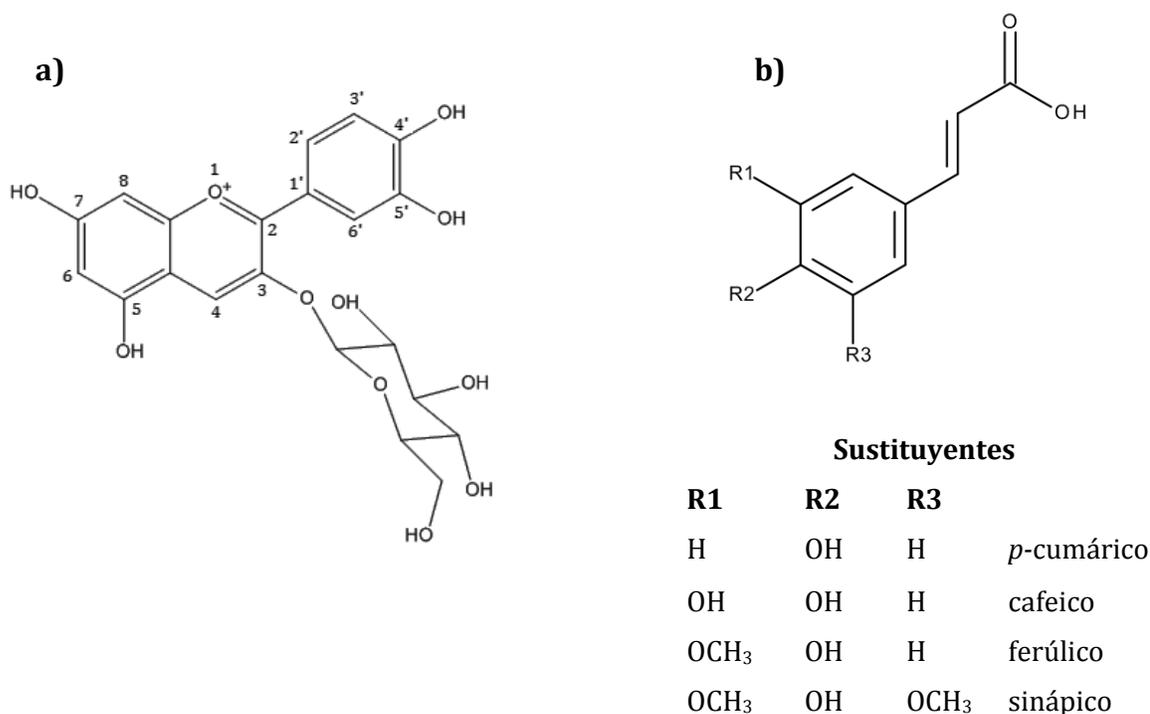


Figura 6. Compuestos fenólicos; a) Estructura de antocianina (cianidina-3-glucósido); b) Estructura del ácido cinámico y sustituyentes de sus derivados.

2.4.2 Esterificación de compuestos fenólicos

En los últimos años se han realizado estudios para lograr la esterificación enzimática de antioxidantes naturales como los AH para su empleo en productos lipofílicos. Stamatis *et al.* (1999) reportaron la síntesis de ésteres de ácido ferúlico con 1-octanol utilizando la lipasa de *R. miehei* con rendimientos del 30%, mientras que Vafiadi *et al.* (2008) reportaron la síntesis de butil ésteres de ácido sinápico empleando la feruloil esterasa tipo A de *A. niger*; éstos mostraron una mayor lipofilicidad que el ácido original, además de resultar efectivos contra la oxidación de LBD. Hasta la fecha, no existen reportes de esterificación de este tipo de moléculas con enzimas diferentes a las ya mencionadas.

Los estudios sobre la esterificación de antocianinas son menos frecuentes y se han realizado casi exclusivamente con CAL-B como biocatalizador (Nakajima *et al.*, 1998) (Stevenson *et al.*, 2006). Dada la poca variación que ha habido en los estudios previos en relación a estas moléculas, es de interés conocer el impacto que tendría el uso de un biocatalizador alternativo a la lipasa B de *C. antarctica* en la producción de colorantes naturales más liposolubles.

3. HIPÓTESIS

El empleo de cutícula de manzana como fuente de carbono induce la producción de una cutinasa de 21 kDa la cual exhibirá propiedades diferentes a la cutinasa de 29 kDa inducida con aceite de olivo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

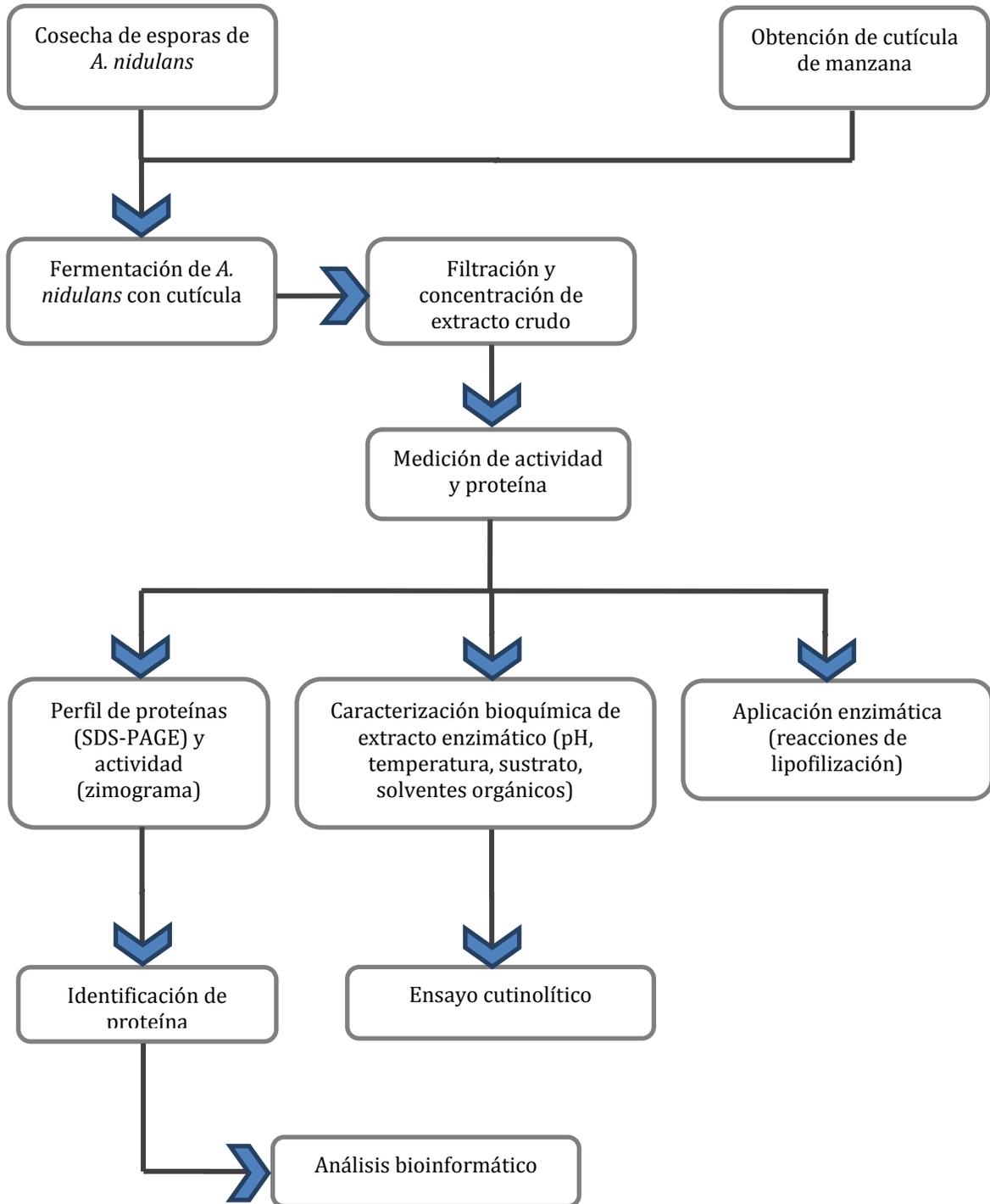
Identificar y caracterizar a la enzima cutinolítica de 21 kDa producida en presencia de cutícula de manzana como inductor y evaluar reacciones para sugerir aplicaciones industriales de interés.

4.2 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones óptimas de producción de un extracto crudo que contenga la enzima cutinolítica de 21 kDa de *A. nidulans*.
- Confirmar la identidad de la enzima cutinolítica mediante la secuenciación de péptidos, así como conocer sus características estructurales mediante análisis bioinformáticos.
- Caracterizar bioquímicamente la actividad cutinolítica en extractos crudos en términos de condiciones de reacción y actividad sobre diferentes sustratos.
- Realizar un tamizaje del extracto crudo enzimático en reacciones de biocatálisis (lipofilización de moléculas).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Estrategia experimental



5.2 Microorganismo

Se utilizó una cepa de *A. nidulans* PW1 (*biA1*; *argB2*; *methG1*; *veA1*), auxótrofa de arginina y no patógena, perteneciente a la FGSC (Fungal Genetics Stock Center) y la cual fue proporcionada por el Dr. Jesús Aguirre del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se utilizaron esporas cosechadas a la semana de incubación y conservadas a 4°C para inocular el medio de cultivo.

5.3 Obtención de cutícula de manzana

Se retiró la cáscara a manzanas de la variedad Golden Delicious y se le agregó a una solución de ácido oxálico (4 g/L) y oxalato de amonio (16 g/L). Posteriormente se llevó a ebullición, para poder separar la pulpa restante de la cáscara, según el método descrito por Kolattukudy (1970). La cutícula se lavó, se filtró y se secó en estufa a 50°C durante una noche. Por último se molió hasta un polvo fino y se almacenó a temperatura ambiente.

5.4 Reactivación de *A. nidulans* PW1 y cosecha de esporas

Se prepararon cajas Petri con medio mínimo a las cuales se les sembró aproximadamente 5 granos de sílica gel con esporas de *A. nidulans* PW1 y se incubaron durante una semana a 37°C. Para cosechar las esporas se agregaron 10 mL de Tween 80 al 0.1% a cada una de las cajas Petri y se rasparon cuidadosamente con una asa micológica; las esporas se recuperaron en un tubo Falcon de 50 mL. Posteriormente se centrifugó el contenido del tubo durante 10 min a 8500 rpm (Centrifuga Biofuge Primo R), se desechó el sobrenadante y se adicionaron 10 mL de agua destilada estéril para nuevamente centrifugar el contenido bajo las mismas condiciones. Este proceso se repitió dos veces y finalmente se resuspendieron las esporas en 10 mL de agua destilada estéril. Una vez obtenida la solución final, se realizó un conteo de esporas en un hematocitómetro para calcular el volumen de solución de esporas a adicionar para futuras inoculaciones. Las esporas se almacenaron a 4°C.

5.5 Preparación e inoculación de medio de cultivo

Se utilizó el medio mínimo descrito por Käfer (1977) y Käfer y Hill (2001); los componentes y sus respectivas concentraciones se enlistan en la **tabla 8**.

Tabla 8. Composición de medio mínimo para *A. nidulans* PW1

Compuesto	Concentración	Solución stock
Sales 20x	50 mL/L	--
Elementos traza 100x	1 mL/L	--
Metionina	0.011 g/L	--
Arginina	5 mL/L	16.8 % w/v
Biotina	0.5 mL/L	0.05 %

La composición de las soluciones de sales 20x y de elementos traza 100x se especifican en las **tablas 9 y 10**. Para preparar cada una, los compuestos se adicionaron en orden a un volumen de 80 mL de agua destilada y se disolvió cada uno antes de adicionar el siguiente. La solución de elementos traza se calentó a ebullición y se dejó enfriar. Las soluciones se aforaron a 100 mL con agua destilada. Para preparar la solución stock de arginina se adicionaron 16.8 gramos a 100 mL de agua destilada y la biotina se disolvió en etanol al 70%. Todas las soluciones se almacenaron a 4°C.

Tabla 9. Composición de solución de sales 20x

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

Tabla 10. Composición de solución de elementos traza 100x

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

Al medio de cultivo se le midió el pH para ajustarlo a pH de 6.5. Una vez alcanzado, se repartió en volúmenes de 50 mL en matraces de 250 mL, se adicionó la cutícula molida de manzana como fuente de carbono e inductor de la enzima, en una concentración inicial de 200 mg por cada 50 mL de medio. Finalmente se esterilizó en autoclave (SM300, Yamamoto) a 121°C por 15 min.

Cada uno de los matraces con 50 mL de medio estéril se inoculó con 1x10⁶ esporas de *A. nidulans* PW1 por mL de medio de cultivo. Las fermentaciones se realizaron bajo las condiciones reportadas por Segoviano-Reyes (2012) a temperatura de 37°C y 300 rpm (Innova 40, New Brunswick Scientific) por tiempos variados. Transcurrido el tiempo de fermentación, la biomasa se separó del medio por filtración simple (filtro Whatman 1 - 110 mm, Whatman Ltd) y el sobrenadante se guardó para ser concentrado por ultrafiltración.

5.5.1 Medio optimizado

El medio mínimo utilizado se modificó con una fuente de carbono adicional para observar los efectos de ésta sobre la producción de la enzima de 21 kDa. De igual manera se estableció variar la cantidad de cutícula adicionada. Las formulaciones ensayadas se enlistan en la **tabla 11**.

Tabla 11. Variación de la fuente de carbono en medio mínimo

	Fuente de carbono 1	Fuente de carbono 2
Medio mínimo +	glicerol 0.1% +	200 mg cutícula
	glicerol 0.5% +	200 mg cutícula
	glicerol 0.5% +	200 mg cutícula
	glicerol 0.5% +	500 mg cutícula
	glucosa 1% +	200 mg cutícula
	glucosa 1% +	500 mg cutícula

5.6 Evaluación de actividad enzimática y de proteína

Las pruebas de medición de proteína y determinación de actividad enzimática se realizaron a muestras tomadas a diferentes tiempos de fermentación. También se realizaron antes y después de la ultrafiltración, a modo de comprobar la presencia de la enzima en el medio de cultivo y en el concentrado.

5.6.1 Determinación de actividad enzimática

Para medir la actividad enzimática se siguió el método descrito por Nawani *et al.* (2006) el cual emplea laurato de *p*-nitrofenilo (*p*NFL) como sustrato. Se adicionaron 0.005 mL de extracto crudo concentrado, 0.895 mL de buffer de fosfatos 0.05M (pH 7.5) y 0.1 mL de sustrato al 0.01M disuelto en etanol absoluto. La reacción se llevó a cabo durante 5 min a temperatura ambiente y se detuvo con la adición de 0.25 mL de Na₂CO₃ 0.1 M por precipitación del sustrato que no reaccionó. La mezcla de reacción se centrifugó a 14000 rpm (Centrifuga Eppendorf 5415 C) durante 10 min y se midió la absorbancia a 420 nm (Biomate 3, Thermo Scientific).

5.6.2 Medición de proteína

Se llevó a cabo utilizando el reactivo de Bradford (Bradford, 1976). Se realizó en tubos Eppendorf, a los cuales se les adicionó el volumen de muestra adecuado, se llevó a 0.8 mL con agua destilada y se adicionaron 0.2 mL de reactivo de Bradford (Bio-Rad). Los tubos se agitaron en vórtex y se midió la absorbancia a 595 nm (Biomate 3, Thermo Scientific). Se utilizó una curva patrón de seroalbúmina bovina como estándar (**ANEXO A**).

5.7 Preparación de zimogramas y perfil de proteínas

El perfil de proteínas y la demostración de la presencia de actividad de esterasa se realizó por medio de la preparación de geles para tinción de plata y zimogramas, respectivamente.

5.7.1 Electroforesis

Se prepararon geles de poliacrilamida para electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) siguiendo el método de Laemmli (1970), utilizando un gel concentrador al 4% y un gel separador al 14%. Las muestras de extracto se suspendieron en buffer de carga y se calentaron a 99°C durante 5 min. Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular bajo, de 14.4 a 116 kDa (Fermentas). Los geles se corrieron a 80 V en una cámara de electroforesis (MiniProtean II Bio-Rad) a 4°C con buffer de corrida.

5.7.2 Tinción con plata

Para la tinción de proteínas en el extracto crudo se utilizó la tinción con plata, siguiendo la metodología descrita para tinción de máxima sensibilidad incluida en el kit de tinción Page Silver™ Silver Staining (Fermentas).

5.7.3 Tinción con azul de Coomassie

Los geles se incubaron en 20 mL de solución teñidora de azul de Coomassie durante un mínimo de 2h; posteriormente se cambió la solución por una desteñidora y se incubaron en agitación hasta eliminar el excedente del colorante y se observaron bandas de proteína, de acuerdo a la metodología descrita en el manual de la cámara de electroforésis MiniProtean II, Bio-Rad.

5.7.4 Zimograma

Para observar la actividad esterasa se prepararon zimogramas siguiendo la metodología planteada por Karpushova (2005). La actividad se observó utilizando α -naftil acetato como sustrato y Fast Red TR como revelador. En la primera etapa, el gel desnaturizante se incubó en un buffer de fosfatos 0.05M, pH 7.5 durante 30 min. En la segunda etapa se renovó el buffer adicionado con Tritón X-100 al 5% y se incubó durante otros 30 min, para así lograr la renaturalización de la enzima. Posteriormente se descartó el buffer y al gel se le adicionó una solución de α -naftil acetato (α -NA) (Solución A), se incubó durante 15 min en agitación a temperatura ambiente y luego se adicionó una solución de Fast Red TR (Solución B) que se dejó incubar hasta la aparición de bandas de actividad.

Las soluciones A y B se prepararon de la siguiente manera:

- **Solución A:** Se pesaron 20 mg de α -naftil acetato, se disolvieron en 5 mL de acetona y se adicionaron 45 mL de buffer de fosfatos 0.05M, pH 7.5.

- **Solución B:** Se pesaron 50 mg de Fast Red TR y se suspendieron en Tritón X-100 al 0.1% y se llevó a 50 mL con el mismo buffer de fosfatos.

5.8 Concentración de extracto crudo

El extracto se concentró hasta un 10-20% del volumen inicial por ultrafiltración (UF) en una celda con agitación magnética (Amicon - Millipore) con una membrana de 10 kDa como límite de peso molecular nominal (NMWL) (Millipore).

5.9 Liofilización

El extracto crudo concentrado se liofilizó para eliminar el agua del medio y así evitar interferencias por el agua libre en las reacciones de lipofilización. El extracto se colocó en un recipiente de plástico y se congeló por inmersión, se sumergió en un baño de hielo seco en etanol absoluto girándose constantemente hasta su congelación. Se liofilizó durante 24h (Labconco Freezone® 4.5). El liofilizado se almacenó a -20°C.

5.10 Identificación de la proteína

La banda de 21 kDa identificada por zimografía se cortó de un gel desnaturizante (Laemmli, 1970) ultrapuro teñido con azul de Coomassie y se mandó a secuenciar a la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología (IBT). Los resultados de la secuenciación se emplearon para realizar un análisis bioinformático que incluyó la comparación de secuencias en BLAST (NCBI y AspGenome Database), la identificación del gen en el genoma de *A. nidulans* (Broad Institute), identificación de péptido señal en SignalP 4.0, obtención de su punto isoeléctrico y peso molecular teóricos (Expasy), naturaleza de residuos de aa (ProtParam), identificación de sitios de glicosilación (NetNGlyc 1.0) e identificación de residuos catalíticos y puentes disulfuro en UniProtKB. La secuencia además se sometió a análisis de predicción de estructuras secundarias (Jpred) y se generó el modelo tridimensional (M4T), el cual a su vez se analizó y comparó con la estructura tridimensional de la cutinasa de *F. solani* (PyMOL).

5.10.1 Metodología de identificación por espectrometría de masas

La muestra fue digerida *in situ* con tripsina y los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS constituido de un cromatógrafo líquido de micro-flujo Accela (Thermo-Fisher Co.) con "splitter" (1/20) y un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co.) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). Para la fragmentación de los péptidos se utilizaron los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High-energy Collision Dissociation), y se seleccionaron los iones con carga 2⁺ y 3⁺. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. Durante la captura automática de los datos se utilizó la exclusión dinámica de iones, con un tiempo de exclusión de 60 segundos. Los datos espectrométricos fueron sometidos a la búsqueda contra la base de datos del NCBIInr a través del programa Matrix science (Mascot Search Result).

5.11 Caracterización del extracto

El método espectrofotométrico para evaluar la actividad enzimática se modificó para ajustarse a las condiciones de reacción empleadas en la caracterización. Las condiciones óptimas para evaluar se fijaron en:

- 100 μL de *p*NFL 10 μM disuelto en etanol absoluto
- 5 μL de extracto crudo concentrado
- 895 μL de buffer de fosfatos 0.05M, pH 7.5
- 1 minuto de reacción medido cada 10 segundos

Una vez establecidas las condiciones de evaluación se calculó el coeficiente de extinción molar (ϵ) para el método modificado, utilizando *p*-nitrofenol 50 μM diluido en etanol; la longitud de onda (λ) de máxima absorción se fijó en 405 nm y el valor de $\epsilon = 14,240 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Una unidad de actividad esterasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto. Todos los experimentos de caracterización se realizaron de esta manera y por triplicado.

5.11.1 pH de actividad

Se emplearon buffers de pH de 5-10; para pH 5 se utilizó buffer de acetatos; pH 6-7, buffer de fosfatos de potasio; pH 8-9, buffer Tris-HCl y para pH 10, CAPS. El sistema de reacción consistió en extracto enzimático (5 μL) + buffer \neq pH (895 μL) + sustrato (100 μL), y se siguió la reacción a 405 nm durante 1 minuto.

5.11.2 Estabilidad a pH

Se incubaron 100 μL de extracto concentrado con 900 μL de cada uno de los buffers a 4°C y a temperatura ambiente; se tomaron muestras de 5 μL a 24 h de incubación y se midió la actividad residual a 405 nm durante 1 minuto.

5.11.3 Temperatura de reacción

Se evaluaron temperaturas desde 20°C hasta 60°C en un espectrofotómetro con control de temperatura (Cary 50 Bio, Varian). Se precalentó el buffer del pH óptimo de reacción y se adicionaron el sustrato y la enzima. La reacción se siguió a 405 nm durante 1 minuto.

5.11.4 Estabilidad a temperatura

Se incubaron 100 μL de extracto concentrado con 900 μL de buffer de mayor estabilidad, a temperaturas de 4°C hasta 60°C; se tomaron muestras de 5 μL a 0.5 h y 1h y se midió la actividad residual.

5.11.5 Especificidad de sustrato

Se evaluaron sustratos de *p*NF ésteres de diferente largo de cadena, desde acetato (2C) hasta estearato (18C); el seguimiento de la reacción se realizó a la temperatura y pH óptimo del ensayo de reacción y a 405 nm durante 1 minuto.

5.11.6 Estabilidad a solventes

Se evaluaron los solventes adecuados para solubilizar la cutina y así poder llevar a cabo reacciones de biocatálisis (Castro-Ochoa, *et al.*, 2012). Estos fueron: dioxano ($\log P = -0.42$), dimetilsulfóxido (DMSO) ($\log P = -1.378$), tert-butanol ($\log P = 0.584$) y una mezcla de etanol-glicerol (50:50) ($\log P \approx -2$), todos miscibles en agua. La naturaleza del solvente influye en la actividad y estabilidad de la enzima, donde la polaridad es un factor importante. Como parámetro para medir la hidrofobicidad de un solvente se utiliza el $\log P$, el cual es el logaritmo del coeficiente de partición de un sustrato en el sistema bifásico estándar 1-octanol/agua. Los solventes con $\log P \leq 2$ son hidrofílicos y son capaces de secuestrar agua unida a la enzima, mientras que solventes con $\log P$ mayores son hidrofóbicos y son adecuados para realizar reacciones de biocatálisis (Da Silva *et al.*, 2003). Para evaluar la estabilidad en los solventes seleccionados, se incubaron 10 mg de extracto liofilizado en 300 μ L de solvente y 700 μ L de buffer de fosfatos de potasio 0.05M, pH 7.5. Se tomaron muestras a tiempo 0, 24, 48, 72 y 96 h y se midió la actividad residual a 405 nm durante 1 minuto.

5.11.7 Ensayo cutinolítico

Se realizaron dos pruebas diferentes para poder confirmar la actividad cutinolítica de la enzima:

- 1. Hidrólisis de cutina.** Estudios previos en el grupo de trabajo determinaron que la cutina es soluble en los solventes dioxano, dimetilsulfóxido (DMSO), tert-butanol (t-ButOH) y en una mezcla etanol:glicerol (50:50) (Castro-Ochoa *et al.*, 2012). Se decidió utilizar t-ButOH por su facilidad de manejo y de recuperación de los productos de reacción. En un vial de 6 mL se puso una reacción que contenía 10 mg de extracto liofilizado que se solubilizó en 700 μ L de buffer de fosfatos de potasio 0.05M, pH 7.5 y 5 mg de cutina pura previamente disueltos en 300 μ L de t-ButOH, para dar un total de 1 mL de reacción. De igual manera se puso una reacción control con los mismos componentes de la reacción a excepción de la enzima. Las reacciones se dejaron correr durante 1 semana a 37°C y 250 rpm; cada 24 h se tomaron muestras para monitorear la aparición de hidroxácidos grasos libres (**Figura 7**), los cuales se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF).
 - **Sistema de CCF:** Hexano: éter etílico: ácido acético (4:6:0.01v/v)
 - **Revelador:** Diclorofluoresceína al 0.1%

Al término del periodo de evaluación las reacciones se dejaron secar al aire libre durante una noche y posteriormente se enviaron los productos de reacción a la Unidad de Servicios de Apoyo

a la Investigación (USAI) de la UNAM, para su análisis por espectroscopía de infrarrojo (IR) en un espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum 400.

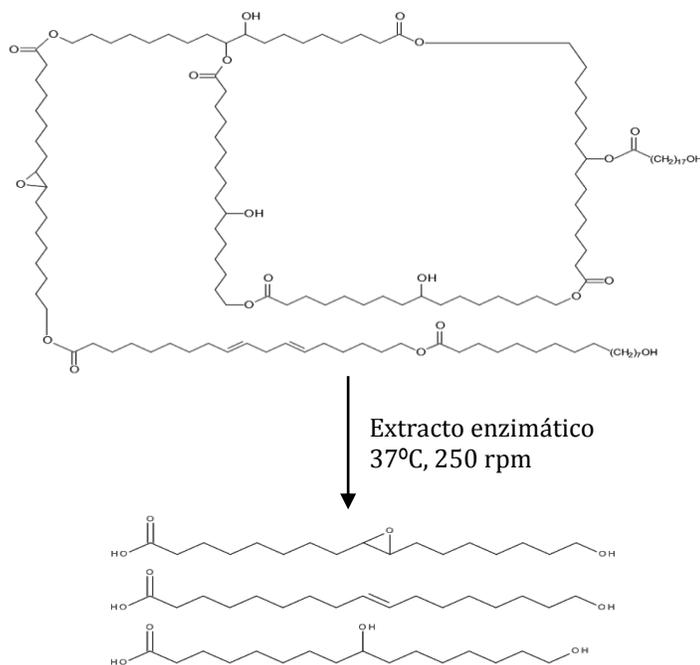


Figura 7. Hidrólisis de cutina. La cutinasa rompe los enlaces éster del polímero liberando monómeros de hidroxiácidos grasos de 16 y 18 carbonos.

2. Hidrólisis de ricinoleato de propilo (PRO). En un vial de 6 mL se puso una reacción que contenía 10 mg de extracto liofilizado y 10 mg de PRO previamente disuelto en una mezcla de 0.5 mL de buffer de fosfatos de potasio pH 7.5 y 1 mL de hexano; por otro lado se puso una reacción semejante con CAL-B para poder comparar la actividad hidrolítica de ambas enzimas con este tipo de sustrato análogo a la cutina. De igual manera se puso una reacción control sin enzima. Las reacciones se dejaron correr durante 3 días a 250 rpm y a 37°C para la cutinasa y 60°C para la lipasa; se tomaron muestras cada 24 h para monitorear la hidrólisis del éster y la aparición del ácido 12-hidroxiocetadeca-9-enoico (**Figura 8**), los cuales se analizaron por CCF.

- **Sistema de CCF:** Hexano: éter etílico: ácido fórmico (9:1:0.01 v/v)
- **Revelador:** Sulfato cérico, yodo

Al término del periodo de evaluación se enviaron los productos de reacción a la USAI para su análisis por espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS) en un espectrómetro de tiempo de vuelo Leco Pegasus III.

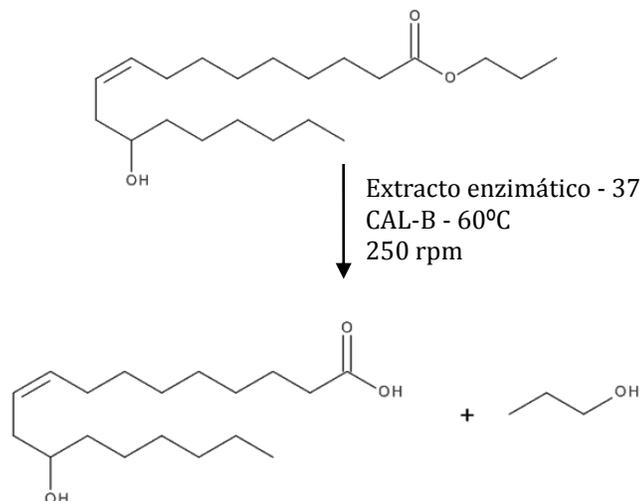


Figura 8. Hidrólisis de ricinoleato de propilo. La cutinasa rompe el enlace éster entre el propilato y ricinoleato liberando ácido ricinoleico y propanol.

5.12 Reacciones de lipofilización

5.12.1 Transesterificación de antocianina

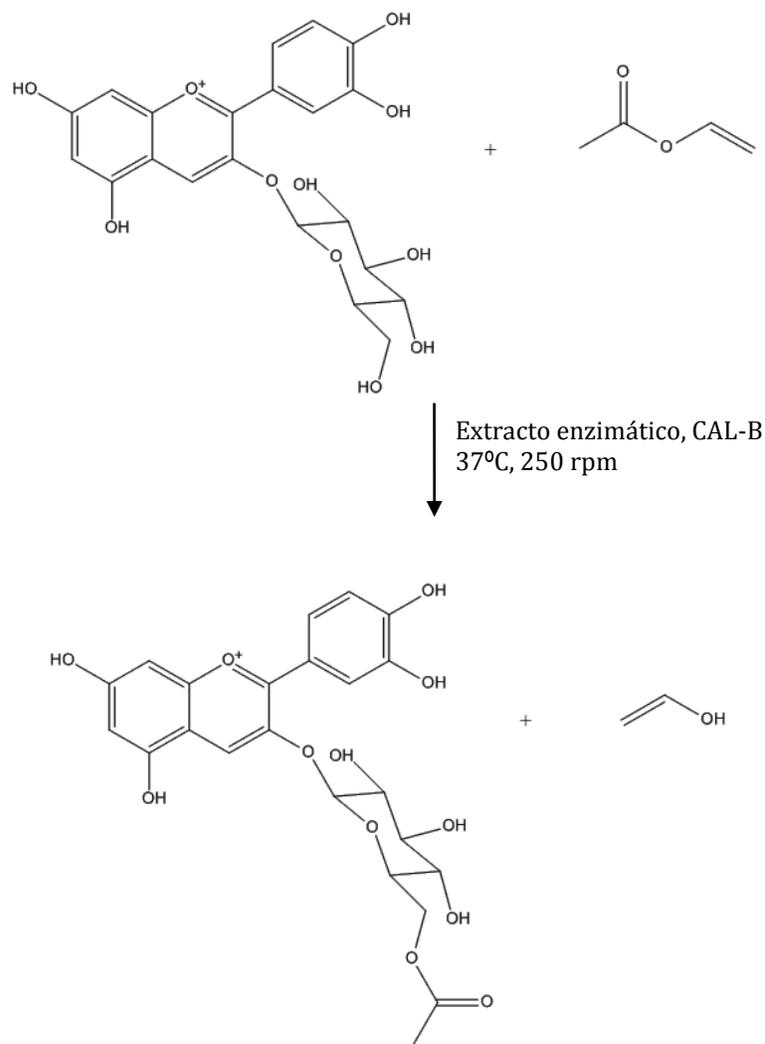
El extracto enzimático liofilizado se empleó para ensayar una reacción de síntesis con la cianidina-3-glucósido (Cya-3-glu) extraída de ciruela y proporcionada por el Dr. Arturo Navarro. También se probó esta reacción con la lipasa B comercial de *C. antarctica* (CAL-B) (Fluka Biochemika). Las reacciones se llevaron a cabo protegidas de la luz durante 2h, en viales de 8 mL y en ausencia de oxígeno para evitar la degradación oxidativa de la antocianina. Los componentes de la reacción se adicionaron en orden y fueron los siguientes: 5 mg de Cya-3-glu (sustrato), 2 mL de isopropanol, 20 mg de enzima (extracto liofilizado o lipasa comercial CAL-B), 100 μ L de acetato de vinilo (donador de acilo) y 10% p/v de tamiz molecular 4Å con tamaño de partícula 4-8 mm de malla (Sigma-Aldrich). La reacción ensayada fue una transesterificación entre el alcohol primario del glicósido de la antocianina y el donador de acilo, el cual es un ácido carboxílico protegido por un grupo vinilo, por lo tanto, se esperaría que los productos de la reacción fueran la antocianina esterificada con un grupo acetato y un alcohol de vinilo, en lugar de la molécula de agua que se genera en las reacciones de esterificación (**Figura 9a**). Tras finalizar el tiempo de reacción, se inyectaron las muestras en una columna de sílica (Hypersil ODS - C18) para analizarlas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase reversa (Waters Corp) y se detectó la absorbancia a 520 nm, longitud de onda a la cual absorbe la antocianina.

5.12.2 Transesterificación de ácido hidroxicinámico

El extracto enzimático liofilizado se empleó para ensayar una reacción de síntesis con el sustrato cumarato de metilo (MCUM), derivado del ácido *p*-cumárico, la cual también se probó con la CAL-B. Las reacciones se llevaron a cabo durante 5 días en viales de 8 mL a 60°C y 200 rpm. Los componentes de la reacción fueron los siguientes: 6 mg de MCUM, 2.5 mL tolueno, 5 µL butanol, 50 mg de enzima (extracto liofilizado o CAL-B) y 10% p/v de tamiz molecular 4Å con tamaño de partícula 4-8 mm de malla (Sigma-Aldrich). La reacción ensayada fue una transesterificación entre el grupo metilo del ácido *p*-cumárico y el butanol, para generar un AH de mayor liposolubilidad, el cumarato de butilo (BCUM), y metanol como productos de reacción (**Figura 9b**). Tras finalizar el tiempo de reacción, se corrieron placas de CCF para comprobar la formación de BCUM, se evaporaron los solventes y se enviaron los productos de reacción a la USAI para su análisis por ESI-MS en un espectrómetro de tiempo de vuelo Leco Pegasus III.

- **Sistema de CCF:** Hexano: acetato de etilo: ácido fórmico (7:3:0.01 v/v)
- **Revelador:** Sulfato cérico, DPPH

a)



b)

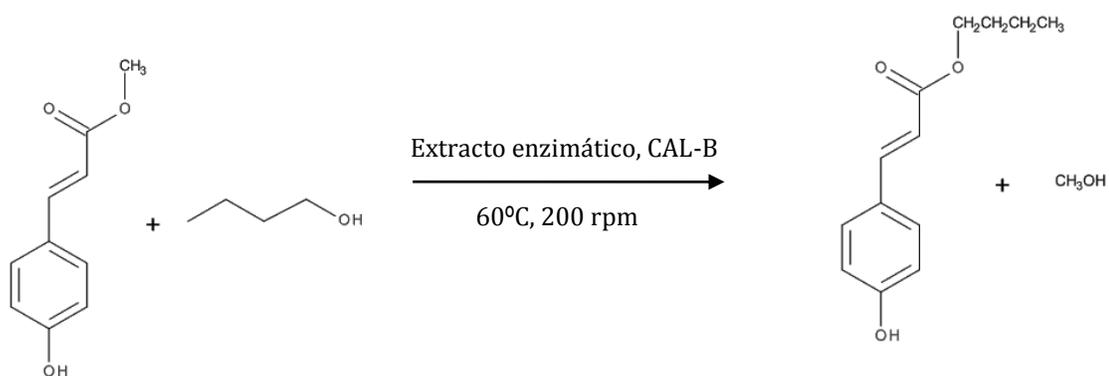


Figura 9. Reacciones de lipofilización de compuestos fenólicos; a) Reacción de transesterificación de cianidina-3-glucósido con acetato de vinilo; b) Reacción de transesterificación de cumarato de metilo con butanol para producir cumarato de butilo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Producción de la enzima

6.1.1 Obtención de cutícula

En el grupo de trabajo se ha empleado cutina pura como inductor, sin embargo, su método de extracción es laborioso. La cutícula de manzana presenta las ventajas de ser un sustrato de fácil obtención y bajo costo. A partir de resultados obtenidos por Segoviano-Reyes (2012) empleando cutina pura como inductor de cutinasas, se sabe que a partir de 12 kg de manzana se obtienen aproximadamente 38 gramos de cutícula, de los cuales 15 gramos corresponden a cutina. De este modo se realizó un ajuste a la concentración inicial de cutícula empleada de 200 mg/50 mL, para adicionar al medio la cantidad de cutícula equivalente a la cantidad de cutina utilizada por Segoviano-Reyes (0.4%) y así poder asemejar más las condiciones de producción de enzima entre ambos tipos de inductores. Se determinó que la cutina constituye aproximadamente el 40% de peso de la cutícula, lo que concuerda con lo reportado por Heredia (2002), y por ello la concentración de 200 mg/50 mL de cutícula se modificó a 500 mg/50 mL (0.4% de cutina). Posteriormente se evaluaron fermentaciones adicionando ambas concentraciones de cutícula y variando la fuente de carbono. De los 20 kg de manzana que se utilizaron en este estudio se obtuvieron 63 g de cutícula. Este lote se utilizó para todos los experimentos posteriores.

6.1.2 Conteo de esporas

Las soluciones finales obtenidas tras las cosechas de esporas contenían entre $7-7.6 \times 10^8$ esporas/mL. Los cálculos para ajustar el volumen de solución para la inoculación dieron como resultado volúmenes entre 65-70 μ L necesarios para inocular 50 mL de medio con una concentración final de 1×10^6 esporas/mL de medio.

6.1.3 Cinética de producción enzimática

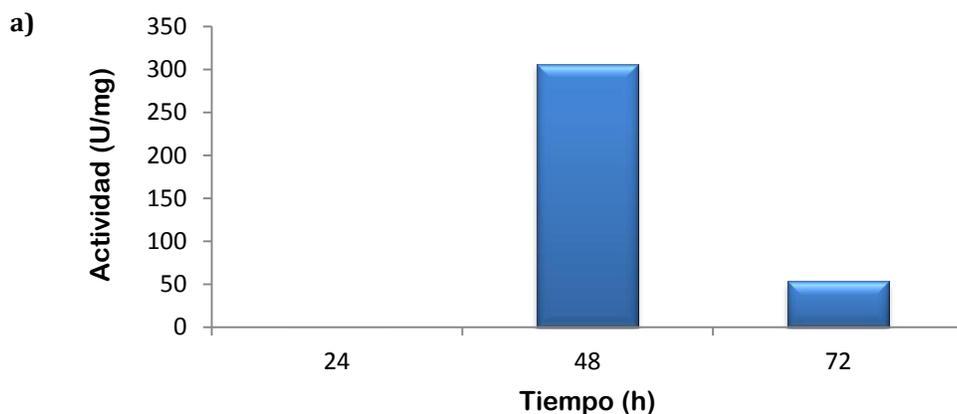
Se realizaron fermentaciones con cutícula de manzana hasta las 72 h a 37°C y 300 rpm para producir la cutinasa de 21 kDa y se evaluó la actividad enzimática y la cantidad de proteína a las 24, 48 y 72 h. No se apreció actividad en el extracto a las 24 h, a las 48 h se registró la mayor actividad y disminuyó a las 72 h (**Figura 10a**). La apreciación de actividad esterasa a partir del segundo día de fermentación sugiere que las fuentes de carbono de fácil asimilación en el medio han disminuido de manera sustancial o se han agotado, y el hongo ahora necesita degradar la cutícula por medio de enzimas para poder seguir obteniendo su fuente de carbono. Por lo tanto, se estableció de manera preliminar que 48 h de fermentación serían adecuadas para obtener una alta actividad enzimática.

Se corrieron geles SDS-PAGE al 14% y se realizó el perfil de proteínas teñidos con plata y geles de actividad (zimogramas) sobre α -NA a los extractos crudos concentrados (**Figura 10b**). En el

perfil proteico destacaron tres bandas de interés a las 48 y 72 h (carriles 3 y 5), además los zimogramas de los mismos extractos mostraron que había dos bandas de actividad esterasa (carriles 2 y 4), las cuales fueron más intensas a las 48 h. Los geles se sometieron a análisis en el programa Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), para obtener un estimado de su peso molecular (PM) (**Figura 10c**). Se observó que las bandas de los carriles 3 y 5 del perfil proteico tienen PM de aproximadamente 21, 31 y 37 kDa, siendo que la de 21 kDa podría corresponder a la cutinasa AN5309 hallada por Castro-Ochoa (sometido), y las dos últimas podrían corresponder a la cutinasa AN7541 (29 kDa) reportada por Castro-Ochoa *et al.* (2012) y la proteasa PrtA (37 kDa) reportada por Peña-Montes *et al.* (2008), respectivamente. En los carriles 2 y 4 del zimograma se comprobó que las dos actividades esterosolíticas presentes corresponden a las bandas de 21 y 29 kDa. La presencia de una proteasa con una banda de igual intensidad a las 48 y 72 h (carriles 3 y 5) (**Figura 10b**), y la disminución general de la actividad esterasa a las 72 h, sobre todo de la 29 kDa (carril 5), sugiere que la proteasa puede estar degradando estas enzimas.

Los perfiles obtenidos con extractos crudos concentrados empleando cutícula de manzana no coincidieron con los resultados iniciales obtenidos por Castro-Ochoa (tesis en proceso) cuando utilizó cutina y cutícula de manzana como inductor, ya que con éstas sólo obtuvo la banda de actividad de 21 kDa y no observó la banda de actividad de 29 kDa. De igual manera, Segoviano-Reyes (2012) observó una sola banda de actividad de 21 kDa al utilizar cutina pura de manzana, aunque reportó un perfil semejante a los de este trabajo al evaluar condiciones de cultivo con KNO_3 como fuente de nitrógeno en lugar del NaNO_3 del medio mínimo (**tabla 9**) reportado por Käfer (1977). Sin embargo, los extractos de las fermentaciones realizadas para esta investigación siempre mostraron un perfil con doble actividad. Es posible que el estado de la cutícula haya influido en los resultados, ya que la composición de la cutícula varía dependiendo de la temporada de cosecha y el estado de maduración del fruto (Holloway, 1973).

Debido a los resultados obtenidos y a que en este estudio se deseaba trabajar con la enzima de 21 kDa para poder caracterizarla en crudo, se buscaron condiciones que favorecieran su producción por encima de la de 29 kDa. Se decidió como primer paso adicionar otra fuente de carbono, además de la cutícula, a las fermentaciones posteriores para observar su efecto en la expresión de estas dos enzimas.



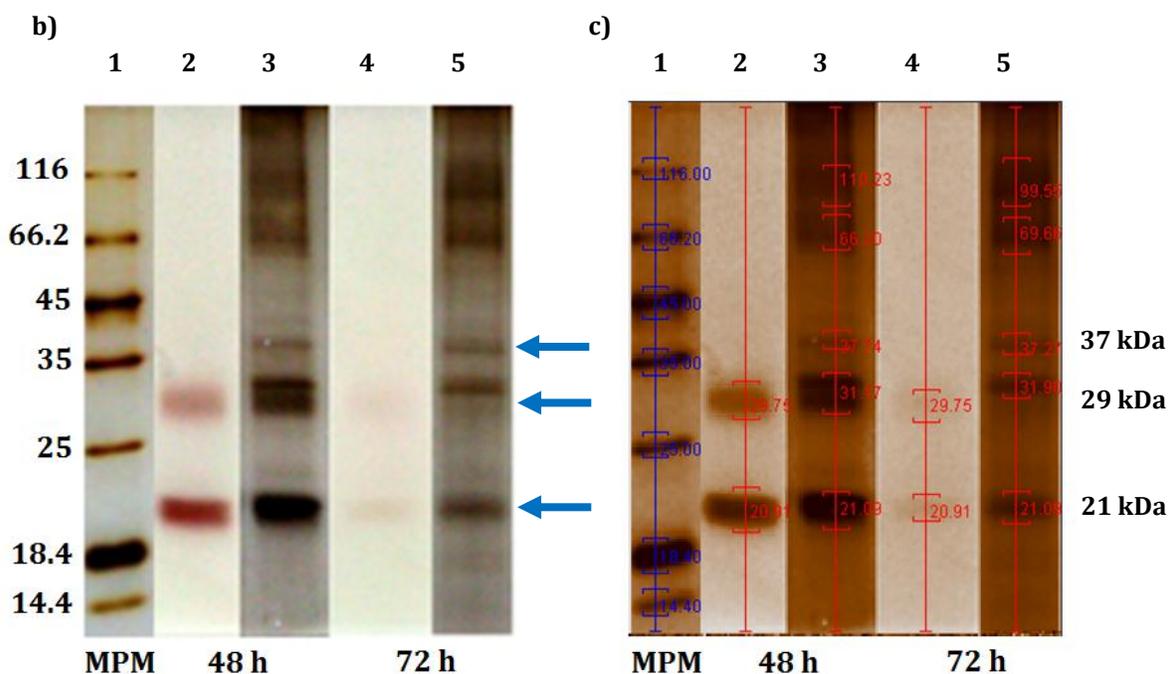


Figura 10. Cinética de producción enzimática con cutícula de manzana; a) Determinación del tiempo de fermentación con mayor actividad. La actividad se midió con un sustrato de cadena media, *p*NFL, y fue mayor a las 48 h; b) Perfil de proteínas y zimogramas de los extractos crudos concentrados a las 48 y 72 h en donde se señalan tres bandas de interés. Carril 1: marcador de peso molecular (MPM), carril 2: actividad *in situ* de esterasa sobre α -NA a las 48 h, carril 3: perfil de proteínas teñido con plata a las 48 h, carril 4: actividad a las 72 h, carril 5: perfil de proteínas a las 72 h; c) Determinación de PM experimental de las bandas señaladas en el panel b. Los PM fueron 21 kDa, que podría corresponder al PM de la cutinasa AN5309, 29 kDa, que podría corresponder al PM de la cutinasa AN7541, y 37 kDa, que podría corresponder al PM de la proteasa PrtA.

6.1.4 Adición de fuente de carbono: glicerol

El glicerol es un compuesto alcohólico con tres grupos hidroxilo que constituye una fuente de fácil asimilación para los microorganismos, desde bacterias (*E. coli*) y levaduras (*S. cerevisiae*), hasta hongos filamentosos como *F. oxysporum* y *A. nidulans*; sin embargo, su mecanismo de transporte está sujeto a represión catabólica por glucosa, por lo que no es la fuente de carbono preferencial para éstos (Castro y Loureiro-Dias, 1991). Fermentaciones preliminares en el grupo de trabajo determinaron que para la producción de cutinasas, el glicerol podía ejercer un efecto represor menor que la glucosa. Castro-Ochoa *et al.* (2012) reportó que una concentración de glicerol al 0.5% disminuye la producción de la cutinasa AN7541 (29 kDa) en un medio con aceite de olivo como inductor. De manera similar, Segoviano-Reyes (2012) evaluó concentraciones de glicerol al 0.1% y 1% para producir la cutinasa AN5309 (21 kDa) en medio con cutina y halló que con glicerol al 0.1% la actividad enzimática fue mayor que con glicerol al 1%. Algunos autores atribuyen este efecto inhibitorio a una inhibición por sustrato o a la interferencia en la

transferencia de oxígeno en el medio de cultivo (Sarkar *et al.* 1998). Por este motivo se prepararon medios de cultivo con glicerol al 0.1% y 0.5% como fuente de carbono adicional a la cutícula y se incubaron durante 48 y 72 h.

Los resultados de las fermentaciones mostraron que al adicionar glicerol, la actividad específica disminuyó considerablemente en comparación con el medio en el que se utilizó únicamente cutícula (2.6 veces). Se observó que la actividad fue mayor a las 48 h con cualquier concentración de glicerol, siendo que al 0.5% resultó 2.3 veces más alta que al 0.1% (**Figura 11a**). En el perfil proteico de los extractos crudos concentrados (**Figura 11b**) se confirmó que a las 48 y 72 h de fermentación del medio con cutícula como única fuente de carbono, están presentes las bandas de 21, 29 y 37 kDa (carriles 2 y 5). En el medio con glicerol al 0.1% ya no se observó la banda de 29 kDa, lo que reflejó el efecto represor del glicerol, aunque es de destacarse que la banda de la proteasa de 37 kDa fue más intensa en esta condición (carriles 3 y 6) a diferencia del medio con cutícula únicamente y con glicerol al 0.5%. Este hecho reflejó una posible inducción de la proteasa con una concentración baja de glicerol y podría estar actuando sobre las enzimas de 21 y 29 kDa. En el medio con glicerol al 0.5% se obtuvieron bandas de 21 kDa de mayor intensidad que las obtenidas con las demás condiciones (carriles 4 y 7) además de que tampoco se observó la banda de 29 kDa. Al haber mayor concentración de una fuente asimilable de carbono en el medio, es probable que no se alcanzara a inducir la cutinasa de 29 kDa en los tiempos evaluados. Por otro lado, la banda de 37 kDa fue menos intensa que con glicerol al 0.1%. Esto podría indicar que la proteasa se reprime con una concentración mayor de glicerol y por ello hay menor cantidad de enzima proteolítica que pueda degradar a las demás enzimas, lo que se refleja en la intensidad de la banda de 21 kDa.

En los geles de actividad se observaron las bandas de 21 y 29 kDa a las 48 y 72 h en los extractos del medio con cutícula únicamente (carriles 8 y 11), y en los extractos de las fermentaciones con glicerol desapareció la banda de 29 kDa, sin importar la concentración de éste (carriles 9-10 y 12-13) y únicamente se apreció la de 21 kDa, la cual siempre fue más intensa con glicerol al 0.5% (carriles 10 y 13).

Estos resultados concuerdan con lo reportado sobre la utilización del glicerol como una fuente de carbono de fácil asimilación y sus efectos represorios sobre las cutinasas (Castro y Loureiro-Dias, 1991) (Castro-Ochoa *et al.* 2012). Debido a estos resultados, se decidió realizar las fermentaciones posteriores con cutícula más glicerol al 0.5% hasta las 48 h para obtener extractos crudos con actividad de cutinasa correspondiente a la cutinasa de 21 kDa.

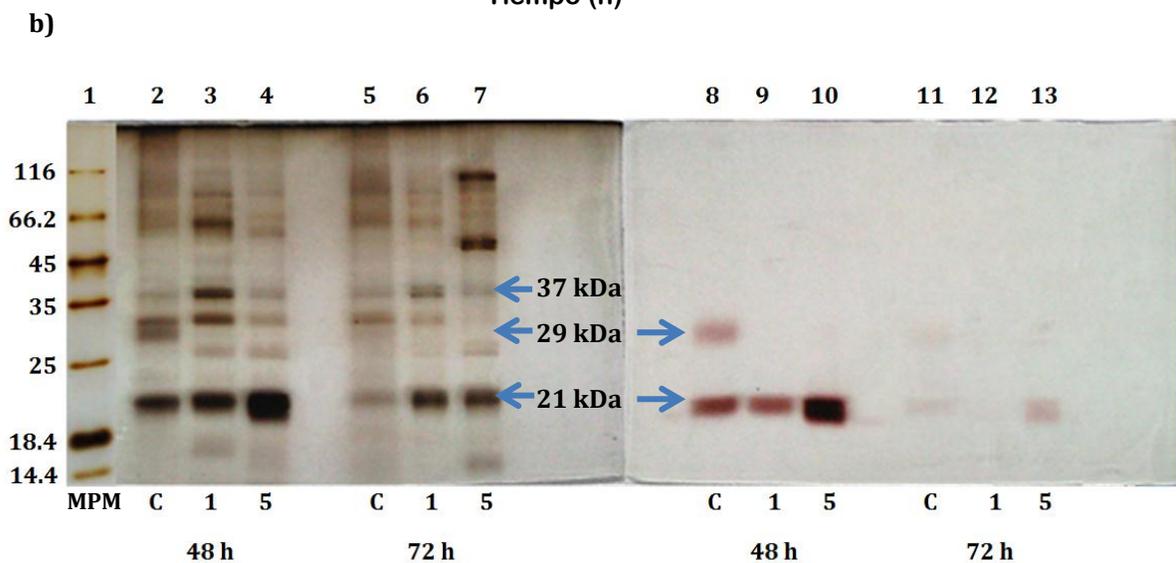
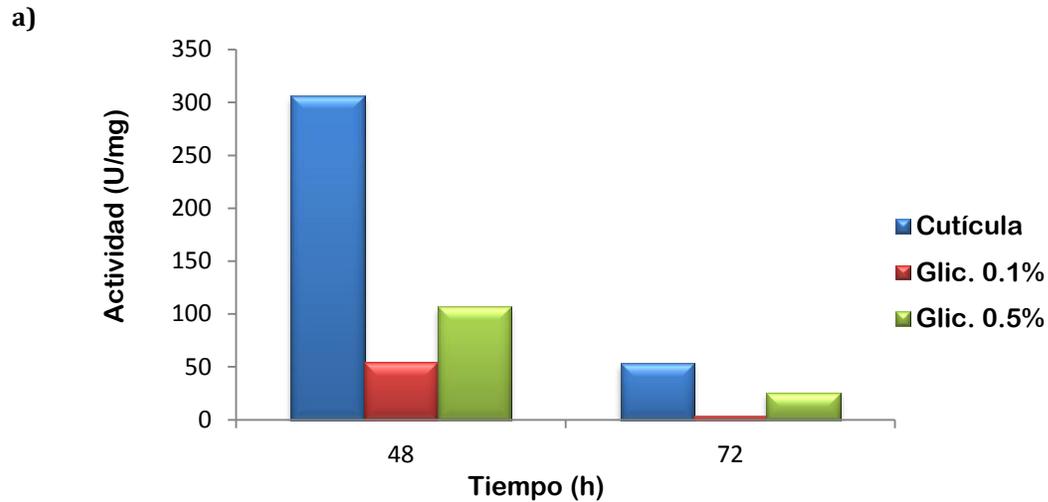


Figura 11. Efecto del glicerol como fuente de carbono adicional; a) Actividad enzimática en los extractos crudos sin y con glicerol al 0.1% y 0.5% a 48 y 72 h de fermentación. La actividad fue menor en los cultivos con glicerol en comparación con el medio adicionado únicamente con cutícula; b) Perfil de proteínas (tinción con plata) (panel izq.) y actividad sobre α -NA (panel der.) a 48 y 72 h de fermentación, donde MPM: marcador de peso molecular, C: medio únicamente con cutícula, 1: medio con cutícula + glicerol 0.1%, 5: medio con cutícula + glicerol 0.5%. En el medio con cutícula (C) se indujeron dos posibles cutinasas, de 21 y 29 kDa, además de una proteasa de 37 kDa (carriles 2 y 5, 8 y 11). En el medio 1 sólo se indujo la cutinasa de 21 kDa (carriles 9 y 12) y se favoreció una mayor inducción de la proteasa (carriles 3 y 6). En el medio 5 se indujo la cutinasa de 21 kDa (carriles 10 y 13) y disminuyó la presencia de la proteasa (carriles 4 y 7).

6.1.5 Efecto de la fuente de carbono y concentración sobre la producción de cutinasas

Una vez que se estableció glicerol 0.5% como la fuente de carbono adicional, se realizaron fermentaciones con diferente concentración de cutícula en el medio: 200 y 500 mg por cada 50 mL de medio (0.4% y 1%, respectivamente), así como fermentaciones donde se reemplazó el glicerol por glucosa al 1% para conocer los efectos de esta fuente de carbono preferencial sobre la actividad enzimática (**Figura 12**). En las cuatro condiciones de fermentación se observó que la actividad enzimática alcanzó su pico a las 48 h de fermentación y decayó a las 72 h. El medio con glicerol 0.5% y cutícula 0.4% ($\approx 0.16\%$ cutina) (200 mg/50 mL) mostró la mayor actividad enzimática a pesar de que hubo una disminución de aproximadamente 30% de su actividad a las 72 h. Como era de esperarse, el empleo de glucosa como fuente de carbono adicional disminuyó considerablemente la actividad enzimática, lo que reflejó el efecto represor que tiene este sustrato primario sobre la inducción de enzimas. La diferencia en actividad entre el extracto con glicerol más cutícula al 0.4% y el extracto con glicerol más cutícula al 1% podría deberse a que, al aumentar la cantidad de cutícula, hay mayor producción de otro tipo de enzimas, como la proteasa mencionada previamente, que puede degradar directamente a la cutinasa, o puede deberse a un efecto de inhibición de la enzima por productos de hidrólisis en el extracto o por efectos de represión al liberarse compuestos que afecten a los factores de transcripción del gen de la cutinasa.

En base a los resultados obtenidos con las diferentes cantidades y fuentes de carbono ensayadas, las fermentaciones con glicerol al 0.5% se pueden fijar como óptimas para la producción de un extracto con la enzima de 21 kDa, a diferencia del medio con cutícula al 1%, ya que la cantidad necesaria de cutícula es casi tres veces menor, lo que se traduce en un ahorro en el inductor.

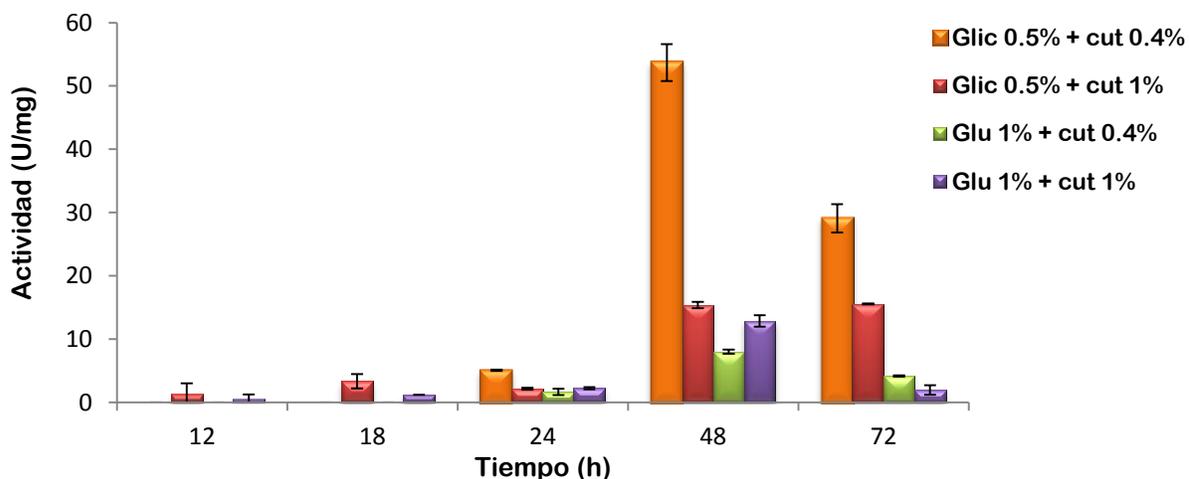


Figura 12. Actividad específica de los extractos crudos con diferentes fuentes de carbono y concentración. Abreviaturas: Glic: glicerol, Gluc: glucosa, cut 0.4%: 200 mg de cutícula por 50 mL de medio, cut 1%: 500 mg de cutícula por 50 mL de medio.

6.2 Identificación de la enzima de 21 kDa

6.2.1 Secuenciación y análisis bioinformático

Para comprobar que la enzima de 21 kDa obtenida en este trabajo, la cual se asumía como una cutinasa, correspondía o no a la misma enzima de 21 kDa hallada por Castro-Ochoa (sometido), se llevó a cabo una fermentación con las condiciones establecidas previamente (48 h de fermentación, glicerol 0.5% y 200 mg de cutícula) y se hizo un gel de poliacrilamida al 14% en condiciones desnaturizantes para identificar la enzima por secuenciación de péptidos. Los resultados mostraron que, efectivamente, la enzima corresponde a una de las cuatro cutinasas reportadas en el genoma de *A. nidulans* y se corroboró como la proteína AN5309 (probable cutinasa 1), la cual está descrita como una hidrolasa extracelular que cataliza la hidrólisis de cutina (UniProtKB). La enzima tiene un peso molecular teórico de 22.74 kDa, el cual se sitúa dentro del rango de pesos moleculares reportados para cutinasas fúngicas (Martinez *et al.*, 1992), y un valor calculado de punto isoeléctrico (pI) de 6.88. Los péptidos obtenidos de la digestión *in situ* tuvieron una cobertura del 65% de la secuencia de la proteína hipotética reportada en el genoma y están señalados en rojo (**Figura 13**). Esta cutinasa está compuesta por 213 aminoácidos. La longitud del gen abarca 984 nucleótidos, de los cuales 867 forman parte de la secuencia codificante. El transcrito del gen abarca desde la base 136145 hasta la 137128 y cuenta con 2 intrones que se distinguen como dos recuadros oscuros en el transcrito (**Figura 14**).

```
1 MKLQLHLALS LLAIVAANP IRLDQRQITG NELRDGSCHD VTFIFARGST
51 ELGYLGSTVG PATCNVLKLR KPGQVACQGV APAYIADLAS NFLPQGNTQI
101 AINEAKSLFE LAASKCPNTK IVAGGYSQGA AVMHAAISTL SSTVQDQIKG
151 VVLFGDTRNK QDGGRIPNFP TDKTKIICAF GDLVCEGTLV ITAAHLSYID
201 DVPDAADFLV GKL
```

Figura 13. Estructura primaria reportada para la cutinasa AN5309, la cual tiene 213 aminoácidos. Los péptidos secuenciados se señalan en rojo.

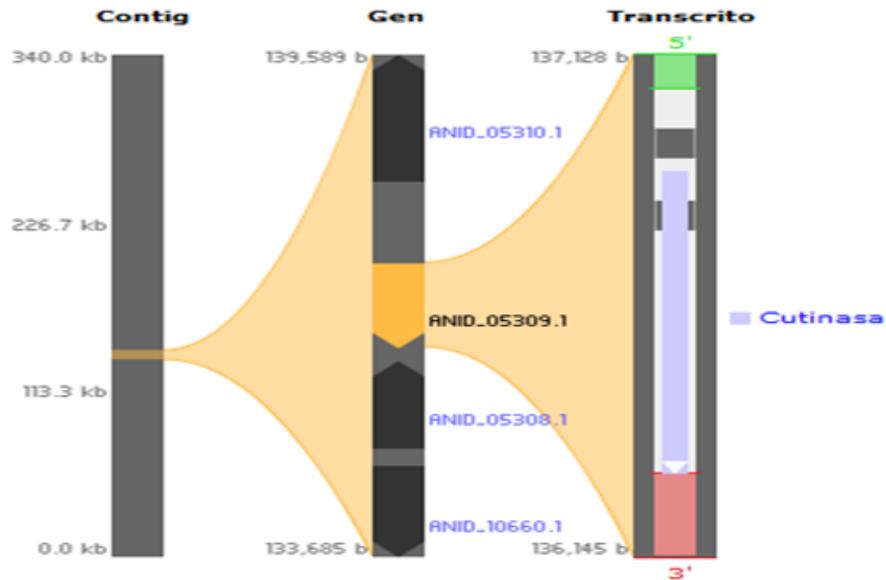


Figura 14. Localización del gen de la cutinasa AN5309 en el genoma de *A. nidulans*. Los intrones se señalan con recuadros gris oscuro y el transcrito final en gris claro.

Los resultados de la secuenciación señalaron que la enzima posee péptido señal, una característica común de las enzimas extracelulares. Por medio del programa SignalP 4.0 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) se calculó la longitud del péptido señal, el cual abarca los primeros 18 aminoácidos de la secuencia, siendo que la ruptura ocurre entre un residuo de alanina y asparagina (VAA-NP); con este dato se calcularon los puntos isoeléctricos y PM de la enzima con y sin péptido señal. La secuencia total, de 213 aa, tiene un pI de 6.88 y un PM de 22.7 kDa, mientras que el producto final, de 195 aa, tiene un pI de 6.32 y un PM de 20.55 kDa (≈ 21 kDa). Por lo tanto, el peso teórico de la enzima extracelular concuerda con lo observado experimentalmente en los geles SDS-PAGE y con el valor calculado en el programa Quantity One.

El análisis de la composición de los aminoácidos de la cutinasa AN5309 en ProtParam (web.expasy.org/protparam/) mostró que 46% de la secuencia total corresponde a residuos de naturaleza alifática (Ala, Ile, Gly, Leu, Val), que se señalan en la **tabla 12**, lo que da como resultado un índice alifático alto (102.21), el cual se define como el volumen relativo ocupado por cadenas laterales alifáticas (Kai, 1980). Además se obtuvo un valor calculado de hidropatía promedio de 0.184 (Kyte y Doolittle, 1982), lo que indica que la enzima es de naturaleza hidrofóbica, que se refleja en los residuos hidrofóbicos que se localizan cercanos al sitio activo y al sitio de unión del sustrato, y en su estructura central de lámina β . Egmond y de Vlieg (2000) observaron que la superficie de la cutinasa de *F. solani pisi* posee residuos cargados positivamente (ej. arginina) en zonas adyacentes al sitio de unión del sustrato, lo que le confiere hidrosolubilidad a pesar de tener un sitio de unión hidrofóbico expuesto al solvente, por lo que se sugiere que la cutinasa AN5309 también presenta una superficie hidrofílica con regiones hidrofóbicas.

Tabla 12. Composición de aminoácidos de cutinasa AN5309

Aa	No. residuos	%	Aa	No. residuos	%
A (Ala)	26	12.2	M (Met)	2	0.9
C (Cys)	6	2.8	N (Asn)	9	4.2
D (Asp)	13	6.1	P (Pro)	9	4.2
E (Glu)	5	2.3	Q (Gln)	11	5.2
F (Phe)	8	3.8	R (Arg)	7	3.3
G (Gly)	19	8.9	S (Ser)	12	5.6
H (His)	4	1.9	T (Thr)	14	6.6
I (Ile)	15	7.0	V (Val)	15	7.0
K (Lys)	11	5.2	W (Trp)	0	0.0
L (Leu)	23	10.8	Y (Tyr)	4	1.9
Total			213		

Los residuos catalíticos de la cutinasa AN5309 se localizan en Ser127, Asp182 e His195, de modo que mantienen una posición muy similar a los residuos catalíticos de la cutinasa de *A. oryzae* (Ser 126, Asp 181 e His 194) (Liu *et al.* 2009) y de la cutinasa de *F. solani pisi* (Ser120, Asp 175 e His 188) (Martinez *et al.*, 1994). Por otro lado, tal como se observa en la **tabla 12**, existen seis residuos de cisteína en la secuencia de AN5309 que pueden formar puentes disulfuro que brinden mayor estabilidad a la enzima.

Por último se introdujo la secuencia de AN5309 en NetNGlyc 1.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) para localizar posibles modificaciones postraduccionales, como la unión de carbohidratos a la enzima. Los resultados indicaron que la AN5309 no posee sitios de glicosilación, a diferencia de la cutinasa de *F. solani pisi* para la cual se ha reportado la presencia de azúcares como manosa y arabinosa unidas a residuos de Ser o Thr (Lin y Kolattukudy, 1980b). El que la cutinasa no posea grupos adheridos se refleja en el hecho de que el PM teórico es semejante al PM experimental; es probable que la ausencia de glicosilaciones se deba a que esta cutinasa pertenece a un organismo saprófito y se induce sólo cuándo es necesaria, en cambio, la cutinasa de *F. solani* proviene de un organismo fitopatígeno que quizá requiera producir una cutinasa de manera constitutiva que le sirva como señalador para iniciar el proceso de invasión y para esto podría requerir la presencia de carbohidratos (Li *et al.*, 2002).

6.2.2 Comparación de secuencias de cutinasas

Se realizaron dos cuadros comparativos utilizando ClustalW (www.genome.jp/tools/clustalw). En el primero se alinearon las secuencias de las cutinasas más parecidas a la AN5309 (**Figura 15**), en conjunto con la secuencia de la cutinasa de *A. oryzae* (63% identidad) y de *F. solani* (50% identidad) como referencias, debido a que estas dos cutinasas cuentan con estructuras reportadas en el PDB; en el segundo cuadro se alinearon las secuencias de las cuatro cutinasas reportadas para *A. nidulans* FGSC A4 (**Figura 16**). Los resultados de la comparación señalaron que las enzimas más parecidas a AN5309 pertenecen todas al género *Aspergillus*, y se identificaron como las siguientes: *N. fischeri* (*Aspergillus fischeri*) NRRL 181 - 211 aa (74% identidad), *A. fumigatus* Af293 - 211 aa (73% identidad), *A. terreus* NIH2624 - 209 aa (71% identidad) y *A. clavatus* NRRL1 - 211 aa (70% identidad). Se observó que entre las siete secuencias se conservan los mismos residuos catalíticos -His, Ser y Asp- (verde), los mismos residuos de la cavidad oxianiónica -Ser y Glu- (azul) y la presencia del pentapéptido consenso característico de las lipasas -G-X-S-X-G- (rojo), sin embargo, en relación a los residuos de cisteína (amarillo), la cutinasa de *F. solani* sólo posee cuatro residuos, a diferencia de las demás cutinasas que cuentan con seis. Se ha reportado previamente que la cutinasa de *F. solani* presenta dos puentes disulfuro (Longhi y Cambillau, 1999), por lo que es probable que la existencia de dos residuos adicionales de Cys sea indicativo de la presencia de un tercer puente disulfuro que brinde una mayor estabilidad a la estructura de la enzimas. Por último el péptido señal de AN5309 se señala en morado. Entre las secuencias de las cutinasas de *A. nidulans* se observaron las mismas características ya mencionadas excepto en ANID10346.2, la cual, al igual que la cutinasa de *F. solani*, sólo posee 4 residuos de cisteína y por lo tanto sólo posee dos puentes disulfuro. Por último, la serina típica de la cavidad oxianiónica se ha reemplazado por un aminoácido similar, treonina en ANID10346. El porcentaje de identidad de estas cutinasas de *A. nidulans* con respecto a ANID5309.2 es el siguiente: ANID7541.2 (65%), ANID7180.2 (53%) y ANID10346.2 (45%).

```

A. nid MKLQLHLALSLLAAIVAA NPIRLDQRQ--ITGNELRDGSC HDVTFIFARG
N. fis ----MKFALLSLAAMAVASPV AIDVRQTAIAGDELRTGPC EPITFIFARG
A. fum ----MKFALLSLAAMAVASPV AIDVRQTAITGDELRTGPC EPITFIFARG
A. ter --MKLLTVLTLTGLVAASPIDLEKR----QRNELRVGAC EEIFTFIFARA
A. cla ----MKFALLALAVALASPVTLDERQIAI PENELRTGPC EPITFIFARA
A. ory --MHLRNIVIALAATAVASPV DLQDRQ-LTGGDEL RDGPC KPITFIFARA
F. sol -----LGRTRDDLINGNSASC ADVIFIYARG
          *           : . . . * : ** : ** .

```

```

A. nid STELGYLGSTVGPATCNV LKLRKPGQVACQGVAPAYIADLASNFLPQGTN
N. fis STEPGLLGITTPGV CNALKSRPGQVACQGVGPAYIADLASNFLPQGTN
A. fum STEPGLLGITTPGV CNALKSRPGQVACQGVGPAYIADLASNFLPQGTS
A. ter STETGYLGGSTGPGV CNGLKLARVQVACQGVAPRYTADLASNFLPQGTS
A. cla STEPGLLGISTGPGV CNGLKLARPFKVACQGVGPAYTADLASNFLPQGTN
A. ory STEPGLLGISTGPAV CNRLKLARS GDVACQGVGPRYTADLPSNALPEGTS
F. sol STETGNLGTLP S IASNLES AFGKDG VVIQGVGGAYRATLGDNALPRGTS
          *** * ** . . . * . * *** . * * * . * ** . ** .

```

```

A. nid QIAINEAKSLFELAASKC PNTKIVAGGYCGA AVMHAAISTLSSTVQDQI
N. fis QIAIDEAAGLFKLAASKC PNTKIVAGGYCGA AVMHGAI RNLP SDVQNM I
A. fum QVAIDEAAGLFKLAASKC PNTKIVAGGYCGA AVMHGAI RNLP SNVQNM I
A. ter QAAIDEAVELFQLAASKC PNTKIVAGGYCGA TAVMHNAI PALPDNIKMI
A. cla QVAIDEATDLFKLAASKC PNTKIVAGGYCGA TAVMHGAI RNLP DN VKNLI
A. ory QAAIAEAQGLFEQAVSKC PNTKIVAGGYCGA TAVMNGAI KRLSADVQDKI
F. sol SAAIREMLGLFQQANTKC PNTKIVAGGYCGA ALAAS IEDLDSAIRDKI
          . ** * ** : * : ** : : : ** : : * : * : : *

```

```

A. nid KGVVLFGDTRNKQDGGRI PNFPDRTKIYCAFGLVCEGTLVITAAHLSY
N. fis KGVVLFGDTRNKQDGGRI PNFPDRTKIYCAFGLVCDGTLIITAAHLSY
A. fum KGVVLFGDTRNKQDGGRI PNFPDRTKIYCAFGLVCDGTLIITPAHLSY
A. ter KGVVLFGDTRNQDGGRI PNFPDRTKIYCAVGLVCEGTLVITAAHFTY
A. cla RGVVLFGDTRNKQDGGRI PNFPDRTKIYCALGLVCEGTLVITAAHFTY
A. ory KGVVLFGYTRNAQERGQIANFPKDKVKVYCAVGLVCLGTLIVAPPHFSY
F. sol AGTVLFGYTKNLQNRGRI PNYPADRTKVF CNTGLVCTGSLIVAPPHFLAY
          * . **** * : * * : * : * : * * : * : * * : * : * : * : *

```

```

A. nid IDDVP-DAADFLVGKL-----
N. fis GDDVP-NATSFLLSKV-----
A. fum GDDVP-SATSFLLSKV-----
A. ter MANVA-DAVSFLLARV-----
A. cla TVNVP-GAVAFLLSKL-----
A. ory LSDTG-DASDFLLSQLG-----
F. sol GPDARGPAPEFLIEKVRVRGSA
          : . * ** : :

```

Figura 15. Secuencias de cutinasas de *Aspergillus* y de *F. solani*. En morado se señala el péptido señal de AN5309, en amarillo se señalan los residuos de cisteína (C), en azul se señalan los residuos de la cavidad oxianiónica (S y Q), en verde se señalan los residuos catalíticos (S, H y D) y en rojo se señala el pentapéptido consenso (-G-Y-S-Q-G-).

```

AN5309      -----MKLQLHLALSLLAAIVAANPIRLDQR-----QIT
AN7541      -----MHFKLLSLAALAGLSVASPLNLDERQHA--VGSSS
AN7180      -----MRFHTILLAALASLVIATPLPSDSTDVSLERRQSMN
AN 10346    MPLPLLPPLLLPLEALLDLALHLVDSTGVAYSARQVTPTAPLPRLRGSST
              : *   :.: :
              :

AN5309      GNELRDGS-CHDVTFFIFARGSTELGYLGSTVGPATCNVLKLRK-PGQVAC
AN7541      GNDLRDGD-CKPVTFFIFARASSTEPGLLGSTGPAVCNDLKADASLGGVAC
AN7180      SNDLEKGD-CKSVAFIFARGSTEIGNMGFVVGPGVCSNLKSTLGSQKQVAC
AN10346     SNDVTDNSGCKELTFIFARGTTEIGNMGTVVGPVKVGEALKSLT-GNKAAI
              .*: : . . * : :*****.:** * :* .** . . ** . . *
              .

AN5309      QGVAPAYIADLASNFLPQGTNQIAINEAKSLFELAASKCPNTKIVAGGYG
AN7541      QGVGPKYTAGLAENALPQGTSSAAINEAKELFELAASKCPDTRIVAGGYG
AN7180      QGVGGAYTAGLIQNALPANTDSGSIKEAVKMFDLAA-KCPDTQIVAGGYG
AN10346     QGVD--YPADAAGNAALGGSGGP---KMASLVETALKQCPDTKIVLGGYG
              *** * * . * . . . : . . . : * :***:*** **
              .

AN5309      QGAVMHAAISTLSSTVQDQIKGVVLFGDTRNKQDGGRIPNFPTDKTKII
AN7541      QGTAVMHGAIPLDSDEIKDKIAGVVLFGDTRNKQDGGQIKNFPKDKIKIY
AN7180      QGSAVIDNAIQKLDDSTRDRVKGVVLFGFTRNLQDKGQIPGYPKDQTKVY
AN10346     QGAMVVHNAASKLSS---GQVVGAVTFGDPFKSQKPD-----NIDQKFTF
              **: *: . * * . . . : : * . * * . : * . . * : *
              .

AN5309      CAFGDLVCEGTLVITAALHLSYIDDVPAADFLVGKL-----
AN7541      CATGDLVCDGTLVVTAALHFTYVANTGEASKWLEQQLASMPASTSTSSSSS
AN7180      CAVGDLVCSGTLIITASHMTYGLNAGDAAKFLASQVSV-----
AN10346     CASGDPVCLN-GANVMAHLSYGNDAQTAQFLVSAAGL-----
              ** ** * . . :*: : * . :*: :
              .

AN5309      -----
AN7541      SSSSAPASQTSQSSGLSSWFSGLGN
AN7180      -----
AN10346     -----

```

Figura 16. Secuencias de cutinasas en el genoma de *A. nidulans* FGSC A4. En morado se señala el péptido señal, en amarillo se señalan los residuos de cisteína (C), en azul se señalan los residuos de la cavidad oxianiónica (S y Q), en verde se señalan los residuos catalíticos (S, H y D) y en rojo se señala el pentapéptido consenso (-G-Y-S-Q-G-).

6.2.3 Estructura secundaria de AN5309

Las estructuras secundarias de la cutinasa se obtuvieron por análisis de la secuencia en el servidor Jpred (www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/index.html), donde 68% de la secuencia registró valores de predicción entre 77-99% de precisión, y el modelo tridimensional se obtuvo por modelado comparativo de la secuencia en el servidor M4T Server 3.0 (manaslu.aecom.yu.edu/M4T/). El software para el análisis de la secuencia de la AN5309 predijo la presencia de cinco hebras β y cuatro α -hélices (**Figura 17**). El análisis del modelo tridimensional se realizó con el programa PyMOL (www.pymol.org), utilizando como proteína base la estructura de la cutinasa de *F. solani pisi* (PDB ID 1CUS). El software para el modelado tridimensional mostró que las hebras β forman una hoja β central, la cual se encuentra rodeada por las cuatro α -hélices, característica de las α/β hidrolasas. Además predijo la existencia de tres puentes disulfuro que se forman entre los siguientes residuos: Cys 38 \leftrightarrow Cys 116, Cys 64 \leftrightarrow Cys 77 y Cys 178 \leftrightarrow Cys 185 (**Figura 18**). Liu *et al.* (2009) reportaron que la cutinasa de *A. oryzae* posee dos puentes disulfuro entre sus residuos Cys 37 \leftrightarrow Cys 115 y Cys 177 \leftrightarrow Cys 184 altamente conservados entre otras cutinasas, como la de *F. solani pisi*. Sin embargo, hallaron la presencia de un tercer puente disulfuro entre los residuos Cys 63 \leftrightarrow Cys 76, el cual aparentemente es único para cutinasas de los hongos del género *Aspergillus* que comparten entre 50-77% de similitud con la secuencia de la cutinasa de *A. oryzae*. Dado que la AN5309 comparte 63% de similitud con ésta última y que la posición de los residuos de cisteína son muy semejantes entre ambas, es muy probable que la AN5309 posea este tercer puente disulfuro que le proporcione mayor estabilidad a su estructura proteica, al unir dos regiones adyacentes por enlaces covalentes.

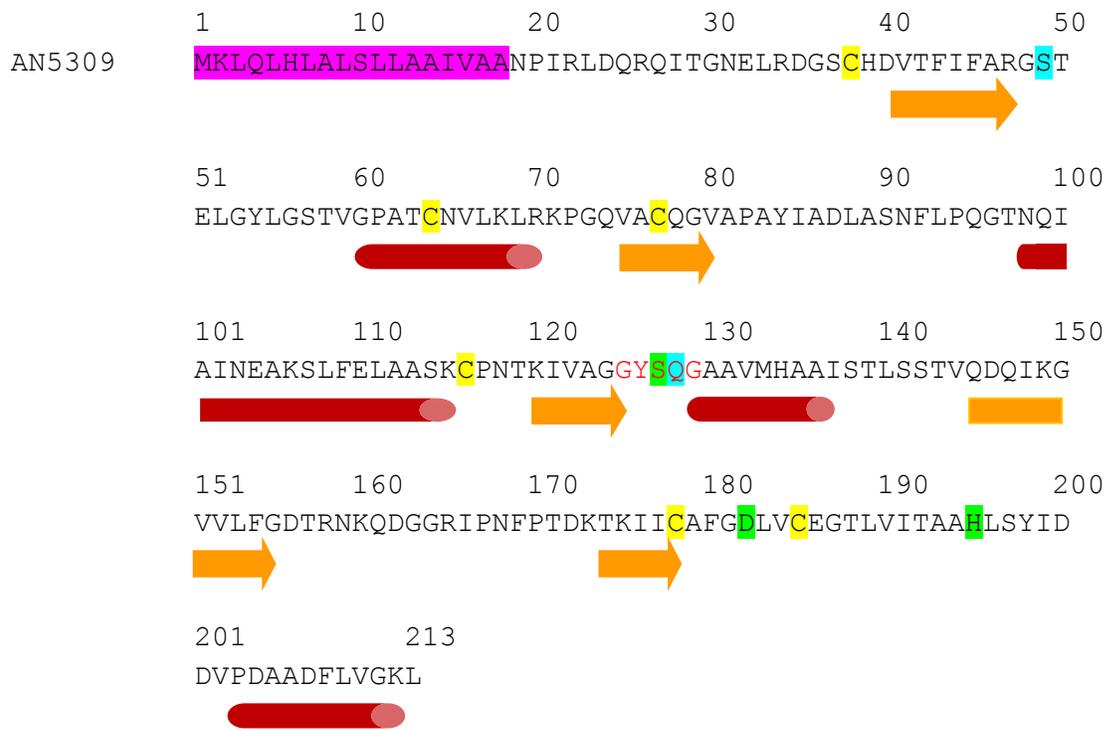


Figura 17. Estructuras secundarias hipotéticas de la proteína AN5309. El péptido señal se marca en morado, las cuatro α -hélices se señalan con cilindros en rojo y las cinco hebras β se marcan con flechas en naranja.

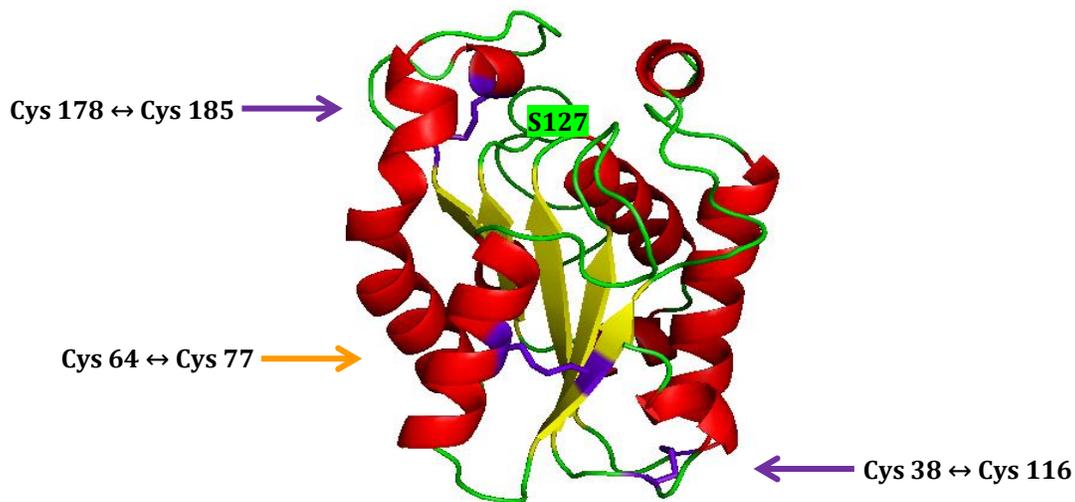


Figura 18. Modelo de la estructura tridimensional de la cutinasa AN5309 de *A. nidulans*. Las cinco α -hélices se señalan en rojo, la hoja β central se señala en amarillo y los puentes disulfuro se señalan en morado. El puente disulfuro característico de las cutinasas de *Aspergillus*, según Liu *et al.* (2009), se señala con la flecha naranja. La cavidad del sitio activo con la Ser catalítica (verde) se localiza en la parte superior del modelo.

6.3 Caracterización del extracto crudo enzimático

6.3.1 pH óptimo de reacción y estabilidad a pH

Tomando como reacción modelo la hidrólisis de pNFL a pH 7.5, el extracto concentrado con la cutinasa AN5309 mostró buena actividad a partir de pH neutro y mejoró a pH alcalinos donde exhibió un pico a pH 9 (**Figura 19a**). La característica de poseer un pH óptimo alcalino se ha reportado para cutinasas como la de las bacterias *Pseudomonas putida* (Sebastian y Kolattukudy, 1988) y *Thermomonospora fusca* (Fett *et al.*, 1999), y la de los hongos *F. solani pisi* (Speranza *et al.*, 2011) y *A. oryzae* (Liu *et al.*, 2009). Vergara-Barroso (2010) encontró que la cutinasa AN7541 de *A. nidulans* también posee un pH óptimo alcalino de 8. En cuanto a la estabilidad a pH, se observó que el extracto con la AN5309 retuvo entre 70-90% de su actividad en cualquiera de los buffers ensayados (pH 5-10) tras 24 h de incubación a 4°C y a temperatura ambiente (**Figura 19b**); esto concuerda con lo reportado por Maeda *et al.* (2005) para la cutinasa de *A. oryzae*, la cual demostró ser estable en un rango de pH 6-11. Sin embargo, Vergara-Barroso (2010) ensayó la estabilidad de la AN7541 durante 24 h a 4°C y encontró que es estable a pH 5-7, con 90% de actividad residual, y después decae con cada incremento de pH hasta llegar a 50% de actividad residual a pH 10.

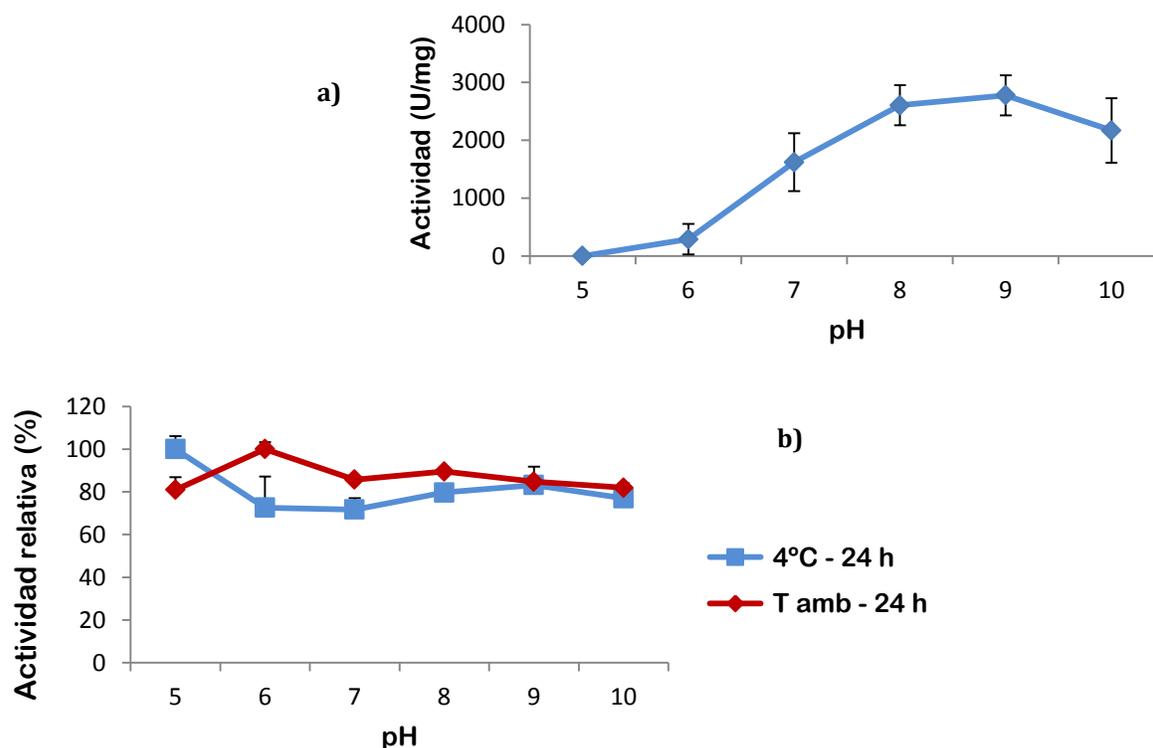


Figura 19. Efecto del pH sobre la actividad de cutinasa en extracto crudo; a) pH óptimo de reacción, el cual fue de 9; b) Estabilidad a pH durante 24 h a dos temperaturas: 4°C y ambiente, donde el 100% correspondió al pH con mayor actividad residual en cada una de las temperaturas de ensayo. El extracto con cutinasa se mantuvo por encima de 70% de actividad residual en los diferentes pH y temperaturas de ensayo.

6.3.2 Temperatura de reacción y estabilidad térmica

Las cutinasas se han reportado como enzimas termoestables y en algunos casos pueden tolerar temperaturas de hasta 80-85°C (Carvalho *et al.*, 1998a) (Dutta *et al.*, 2009). El extracto con la cutinasa AN5309 mostró un pico de actividad a los 30°C, a partir de la cual disminuyó su actividad hasta casi un 50% a 50°C y a 10% a 60°C (**Figura 20a**). Un comportamiento similar se ha observado para la cutinasa de *A. oryzae* (Liu *et al.*, 2009) y para la cutinasa AN7541 (Vergara-Barroso, 2010). La estabilidad del extracto a diferentes temperaturas se midió a 30 y 60 min, en se mantuvo estable hasta 40°C, después mostró una ligera pérdida de actividad (aprox. 20%) a 50°C y luego se observó una disminución drástica a los 60°C, donde sólo retuvo el 5% de actividad tras 1 hora de incubación (**Figura 20b**). Maeda *et al.* (2005) reportaron un comportamiento similar para la cutinasa de *A. oryzae*, la cual se mantuvo estable hasta 37°C y posteriormente disminuyó a 20% de actividad residual a 60°C tras 30 min de incubación. Speranza *et al.* (2011) obtuvieron resultados semejantes para la cutinasa de *F. oxysporum*, en donde la enzima se mantuvo estable hasta 45°C tras 1 h de incubación. La inmensa pérdida de actividad del extracto a 60°C sugiere una desnaturalización térmica de las enzimas de la cual no pueden recuperarse. Sin embargo, la tolerancia a 50°C reflejó termoestabilidad que se asocia con algunas cutinasas por la presencia de tres puentes disulfuro (Liu *et al.*, 200), los cuales ayudan a mantener la estructura activa de las enzimas a pesar de ser sometidas a calentamiento. Dada la semejanza que muestra la AN5309 con la cutinasa de *A. oryzae*, es probable que su estabilidad térmica se deba en gran parte a esta característica.

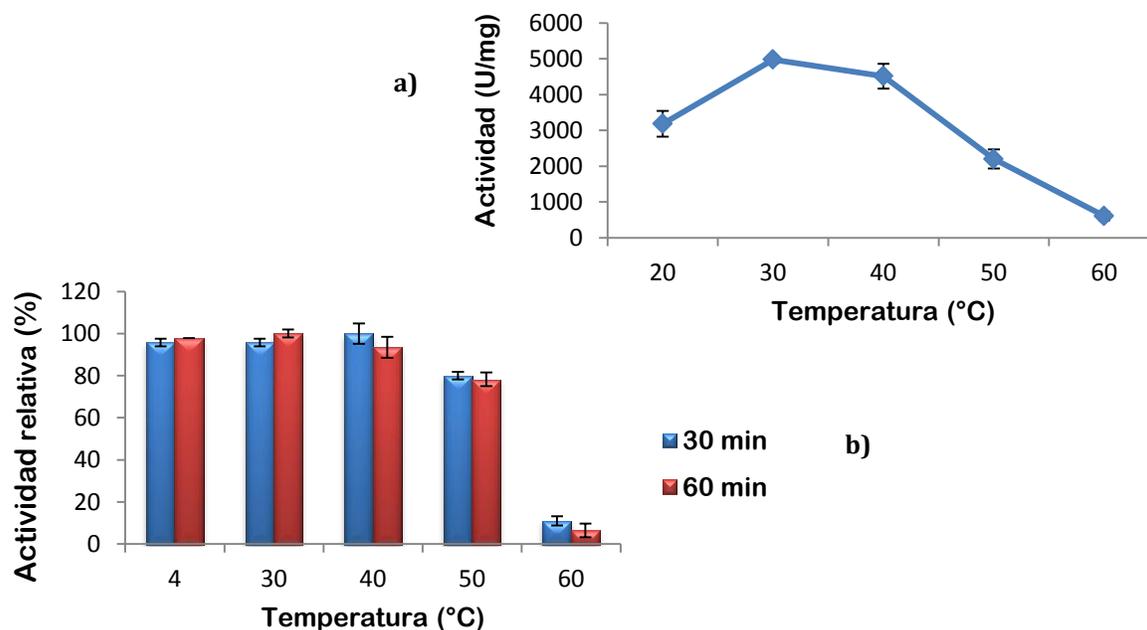


Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la actividad de cutinasa en extracto crudo a dos tiempos diferentes: 30 y 60 min; a) Temperatura óptima de reacción, la cual fue de 30°C; b) Estabilidad a diferentes temperaturas (4, 30, 40, 50 y 60°C), donde el 100% correspondió a la temperatura con mayor actividad residual en cada uno de los tiempos de ensayo. El extracto con cutinasa fue estable en todas las temperaturas de incubación excepto a 60°C.

6.3.3 Especificidad de sustrato

Las cutinasas se clasifican como enzimas que actúan sobre un polímero insoluble de hidroxiácidos grasos de cadena larga, sin embargo, la mayor especificidad de sustrato del extracto con la AN5309 se encontró en el rango de ésteres de cadena media, entre 8 y 14 carbonos (**Figura 21**). Este hallazgo es diferente a lo reportado para la cutinasa de *F. solani*, ya que ésta actúa preferencialmente sobre sustratos de cadena corta (Sebastian y Kolattukudy, 1988), mostrando mayor afinidad por sustratos de cuatro carbonos (Kodama *et al.*, 2009). Liu *et al.* (2009) compararon las estructuras de las cutinasas de *F. solani* y *A. oryzae* (reportadas en el PDB) y notaron que el sitio activo de la cutinasa de *F. solani* se encuentra localizado en una cavidad más angosta y menos profunda que la de la cutinasa de *A. oryzae*, la cual actúa sobre sustratos de cadena más larga. La forma de la cavidad del sitio activo en la AN5309 podría explicar de igual manera su especificidad de sustrato, siendo que su cavidad podría ser más parecida a la de la cutinasa de *A. oryzae*. Vergara-Barroso (2010) reportó que la cutinasa AN7541 de *A. nidulans* mostró mayor afinidad por sustratos de cadena larga, de 16 y 18 carbonos, y ensayos realizados por Castro-Ochoa *et al.* (2012) confirmaron la preferencia de esta misma enzima por sustratos como trioleína, ácido esteárico (18 carbonos) y ácido araquídico (20 carbonos), lo que concuerda con el hecho de que esta enzima se induce con sustratos de cadena larga como el aceite de olivo, lo cual no ocurre con la AN5309.

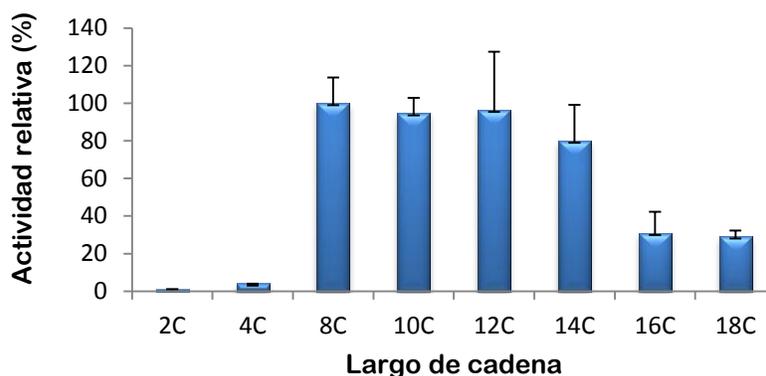


Figura 21. Especificidad de sustrato del extracto con la AN5309 con ésteres de *p*-nitrofenilo de diferente largo de cadena, donde el 100% correspondió al sustrato de mayor actividad residual en el ensayo (8C). El extracto enzimático mostró preferencia por sustratos de cadena media, de 8 a 14 carbonos e hidrolizó en menor medida los sustratos de cadena larga, de 16 a 18 carbonos. El extracto no fue efectivo sobre sustratos de cadena corta, de 2 a 4 carbonos.

6.3.4 Estabilidad en solventes

Entre los solventes ensayados para llevar a cabo la hidrólisis de cutina, la mezcla EtOH-glic es la de mayor hidrofiliicidad ($\log P \approx -2$), seguido del DMSO ($\log P = -1.378$), el dioxano ($\log P = -0.42$) y el t-ButOH ($\log P = 0.584$). Las muestras al tiempo cero de incubación tuvieron actividad para todos los solventes, siendo el t-ButOH el más bajo en actividad con 85% con respecto al control. Sin embargo, a partir de las 24 h el extracto en dioxano no mostró actividad, con lo que quedó demostrado que este solvente no es adecuado para realizar reacciones de biocatálisis con cutinasas. En todos los tiempos de ensayo, el mejor solvente fue la mezcla EtOH-glic, la cual retuvo hasta 65% de actividad a los cuatro días de incubación, seguido del DMSO (30% actividad residual) y t-ButOH (20%) (**Figura 22**). Castro-Ochoa *et al.* (2012) reportaron un comportamiento semejante para la AN7541 en DMSO, EtOH-glic y t-ButOH. El comportamiento del extracto con la AN5309 en estos solventes también se apoya en la naturaleza de los solventes, ya que en cuanto a su polaridad, la mezcla de EtOH-glic y el DMSO son solventes polares, el t-ButOH lo es en menor medida por su cadena de cuatro carbonos y por último el dioxano es un solvente no polar. Esto explica la mayor estabilidad en la mezcla EtOH-glic y la inactividad en dioxano y se concluye que el extracto enzimático es mayormente estable en solventes polares.

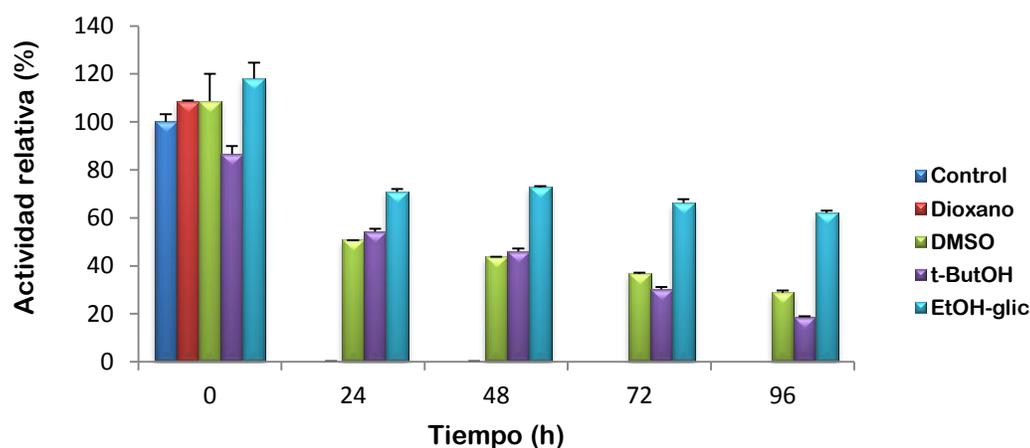


Figura 22. Estabilidad en solventes del extracto con la AN5309. Se probaron cuatro solventes en los cuales se solubiliza la cutina: dioxano, dimetilsulfóxido (DMSO), tert-butanol (t-ButOH) y una mezcla de etanol-glicerol (EtOH-glic/50:50). El 100% correspondió a la actividad del control (hidrólisis de pNFL en buffer sin solvente) a tiempo cero. La cutinasa mostró mayor estabilidad en la mezcla EtOH-glic, manteniéndose por encima del 60% de actividad residual en todos los tiempos de ensayo.

6.3.5 Ensayo cutinolítico

6.3.5.1 Hidrólisis de cutina

En el primer ensayo cutinolítico, se corrieron placas de cromatografía en capa fina (CCF) y se revelaron con diclorofluoresceína al 0.1% para observar los hidroxiácidos grasos de 16 y 18 carbonos liberados como producto de la reacción de hidrólisis de la cutina. En las placas no se observaron manchas que pudieran indicar la presencia de hidroxiácidos grasos libres. Es posible que el sistema de solventes empleado (hexano: éter etílico: ácido acético, 40:60:0.01 v/v) no fuera el adecuado para lograr una separación de los productos, aunque Castro-Ochoa *et al.* (2012) reportaron una separación efectiva de hidroxiácidos grasos de cutina con un sistema semejante. Esto indicó que el extracto enzimático con la AN5309 quizá no pudo degradar este biopolímero (**Figura 23**). Para confirmar si hubo hidrólisis de la cutina, los productos de reacción se mandaron a analizar por espectroscopía de infrarrojo (IR). Castro-Ochoa *et al.* (2012) reportaron que la cutinasa AN7541 hidrolizó cutina pura de manzana a las 72 h de reacción. De acuerdo con datos de Pacchiano *et al.* (1993), analizaron los picos de absorción del espectro de la cutina pura (**ANEXO C**) y los compararon con los picos del espectro de los productos de hidrólisis y observaron la aparición de un pico de absorción a $1,720\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a ácidos carboxílicos presentes, es decir, hidroxiácidos grasos liberados, la desaparición de un pico a $1,731\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a enlaces éster, en este caso son los enlaces éster de la cutina, y la disminución de un pico de absorción de agua que se absorbe al biopolímero, a $1,627\text{ cm}^{-1}$. El espectro IR de la hidrólisis de cutina con el extracto con la AN5309 presentó picos semejantes a los que se aprecian en el espectro de la cutina pura, ya que se observaron picos a $1,731\text{ cm}^{-1}$ y $1,627\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a los enlaces éster de la cutina y a las moléculas de agua absorbidas en ésta. De este modo se comprobó que el extracto crudo con la cutinasa AN5309 no hidrolizó a la cutina (**Figura 24**). De acuerdo a estos datos y a la preferencia exhibida por los sustratos de cadena media, se podría sugerir que la cutinasa AN5309 no es la enzima encargada de iniciar la degradación de este biopolímero, sino que probablemente se induce con los monómeros de cutina o cuando se detectan componentes de menor tamaño presentes en la cutícula de las plantas.

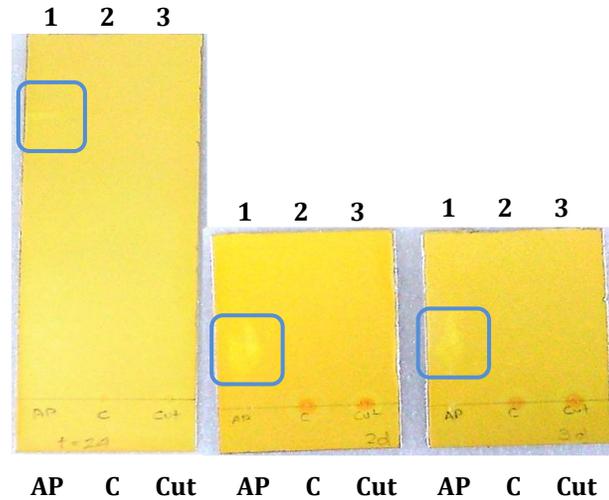


Figura 23. Cromatografía en capa fina de los productos de reacción de la hidrólisis de cutina realizado por triplicado. Las placas se revelaron con diclorofluoresceína al 0.1% y como estándar se utilizó ácido palmítico. Carril 1: ácido palmítico (AP), única mancha visible (recuadros), carril 2: reacción control sin enzima (C), carril 3: reacción con extracto con cutinasa (Cut). En los carriles 2 y 3 no se observaron manchas que pudieran indicar la liberación de hidroxiácidos grasos.

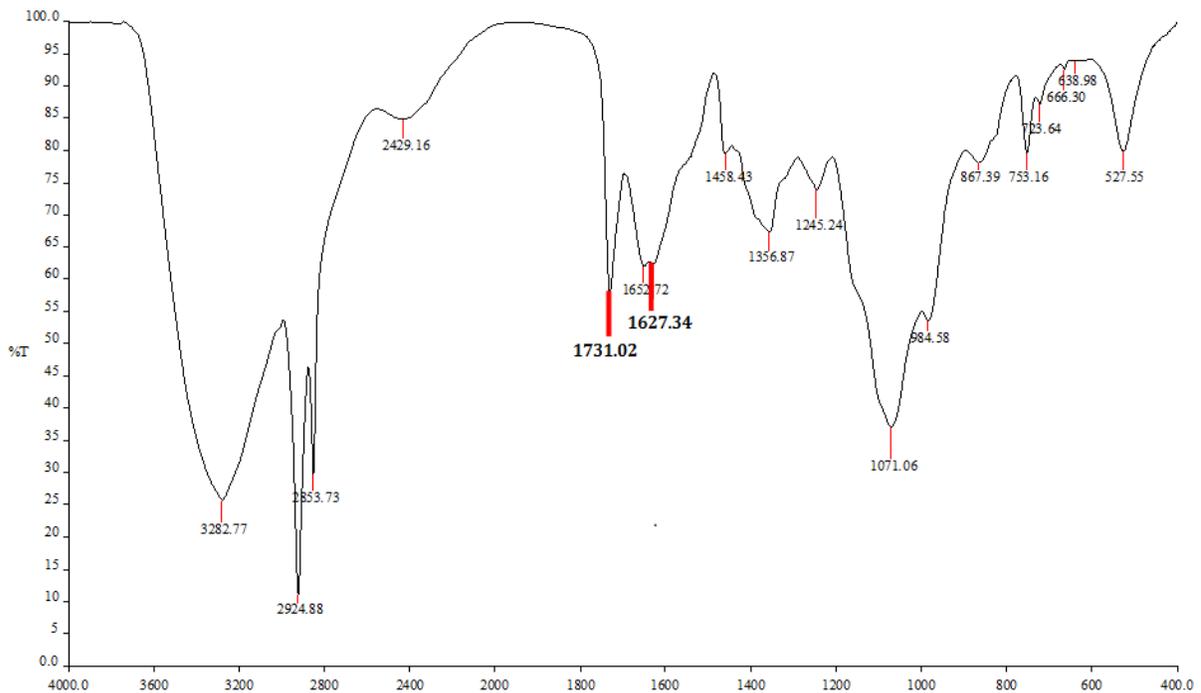


Figura 24. Espectro infrarrojo de la reacción de hidrólisis de cutina de manzana con el extracto crudo liofilizado con la AN5309. Se observaron picos de absorción característicos de la cutina pura (1,731 cm^{-1} y 1,627 cm^{-1}), lo que indicó que el extracto no hidrolizó la cutina.

6.2.4.2 Hidrólisis de ricinoleato de propilo

Se realizó una prueba alterna a la hidrólisis de cutina para conocer si el extracto con la cutinasa AN5309 es capaz de hidrolizar un sustrato semejante a ésta, pero de menor complejidad. Se utilizó un éster propílico del ácido ricinoleico, el cual es un ácido graso de 18 carbonos que posee un grupo hidroxilo (C12) y un doble enlace (C9↔C10) intermedios, tal como los que se encuentran en los hidroxiácidos grasos que componen a la cutina, aunque no cuenta con el grupo hidroxilo en el extremo de la cadena del ácido graso. Las placas de CCF reveladas con yodo mostraron una disminución en la intensidad de la mancha del ricinoleato de propilo (PRO) en las reacciones con la cutinasa (Cut) y la lipasa B de *C. antarctica* (CAL-B) entre el primer y tercer día de reacción, además se apreciaron unas manchas en la parte inferior de las dos reacciones que podrían corresponder al hidroxiácido graso libre (**Figura 25**); para corroborar la hidrólisis del propiléster (PM= $340 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$) y por ende la liberación del ácido ricinoleico (AcRic) (PM= $298 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$), se analizaron los productos de las reacciones por ESI-MS (**Figuras 26a y 26d**). Los espectros de las reacciones con la Cut y la CAL-B mostraron cuatro picos con patrones de ionización semejantes; a los 313 segundos (pico 4 - Cut) y 314 segundos (pico 6 - CAL-B) se observó la presencia del ion molecular [M] m/z 298, el cual corresponde al peso molecular del ácido ricinoleico (**Figuras 26b, 26e**); del mismo modo, a los 339 segundos (pico 10 - Cut) y 338 segundos (pico 7 - CAL-B) se observó la presencia del ion m/z 322, el cual corresponde al peso molecular del ricinoleato de propilo menos una molécula de agua ($340-18= 322 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$), la cual es una de las pérdidas típicas que puede sufrir el ion molecular [M] (**Figuras 26c y 26f**); este mismo ion m/z 322 se observó en el espectro del PRO, el cual se utilizó como estándar (**ANEXO D**). Se comprobó que el extracto con la AN5309, a pesar de que no hidrolizó su sustrato natural, sí pudo llevar a cabo la hidrólisis de un sustrato más sencillo, aunque en menor medida que la CAL-B. Con este ensayo se puede sugerir que el extracto se puede emplear en reacciones de síntesis e hidrólisis de moléculas como ésteres de alcoholes o ácidos grasos de cadena media o larga.

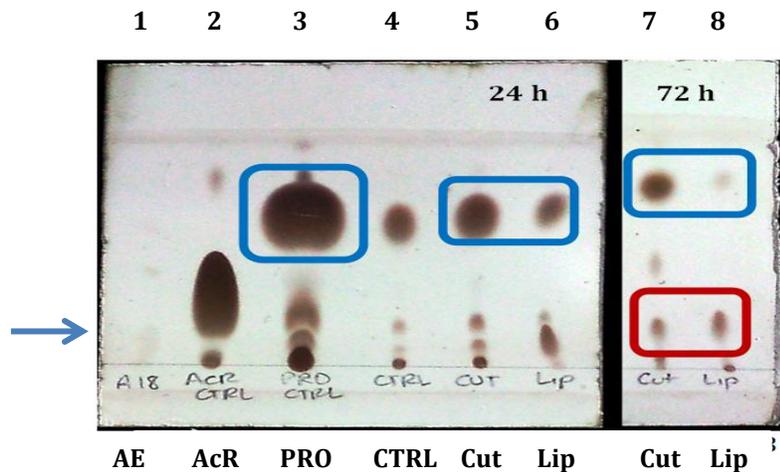
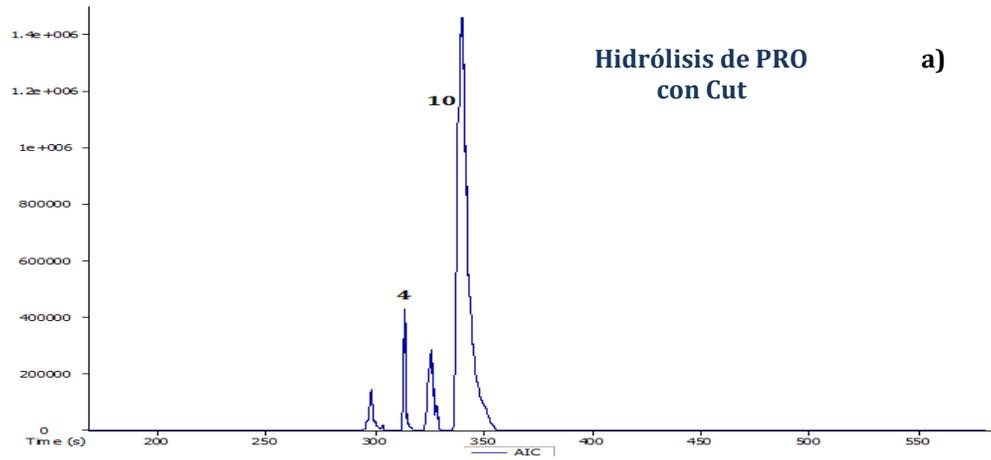
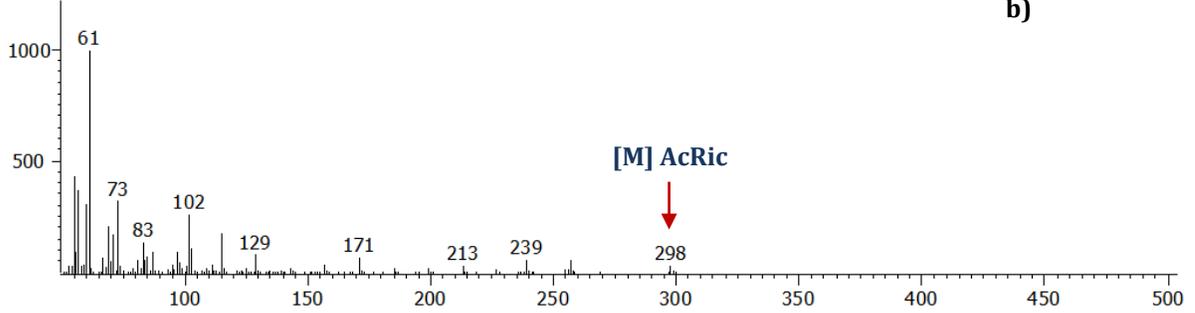


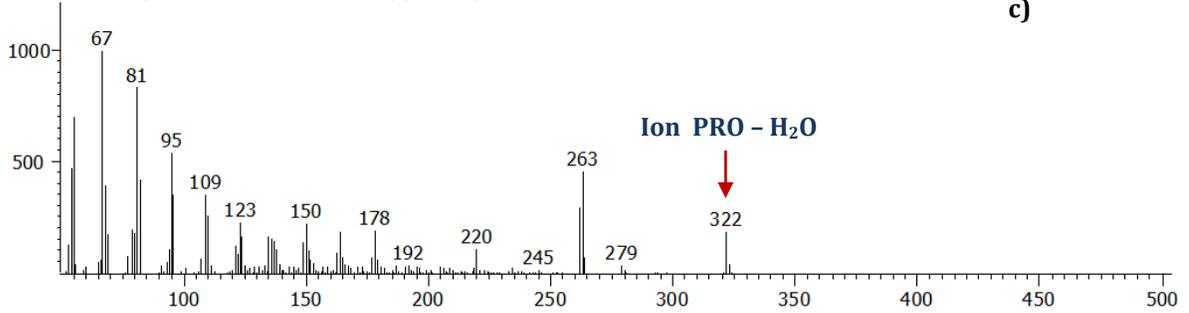
Figura 25. Cromatografía en capa fina de los productos de reacción de la hidrólisis del ricinoleato de propilo. En los carriles 1-4 se colocaron controles. Carril 1: ácido esteárico (AE), carril 2: aceite de ricino (AcR), carril 3: ricinoleato de propilo (PRO), carril 4: reacción sin enzima (CTRL), carril 5: reacción con extracto con la AN5309 (Cut) a las 24 h, carril 6: reacción con lipasa B de *C. antarctica* (Lip) a las 24 h, carril 7: reacción con extracto con la AN5309 (Cut) a las 72 h, carril 8: reacción con lipasa B de *C. antarctica* (Lip) a las 72 h. En los cuadros azules se señalan las manchas correspondientes al PRO en el control (carril 3) y en las reacciones a dos tiempos de muestreo (carriles 5-8). A las 72 h de reacción las manchas del PRO fueron menos intensas, sobre todo con la lipasa, y aparecieron unas manchas en la parte inferior (cuadro rojo) que se atribuyeron a ácidos grasos como el ácido ricinoleico, a la altura de una ligera mancha en el carril 1 del ácido esteárico (flecha).

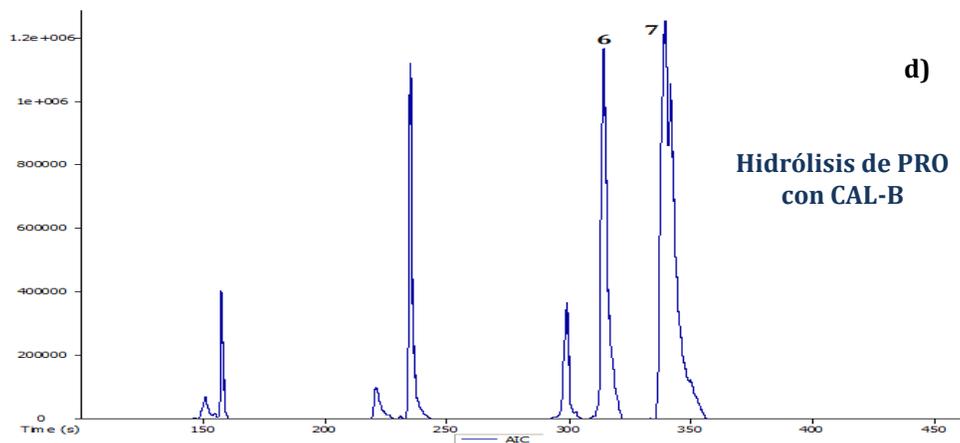


Peak True - sample "OT7722-PRO-CUT21:1", peak 4, at 313.497 s

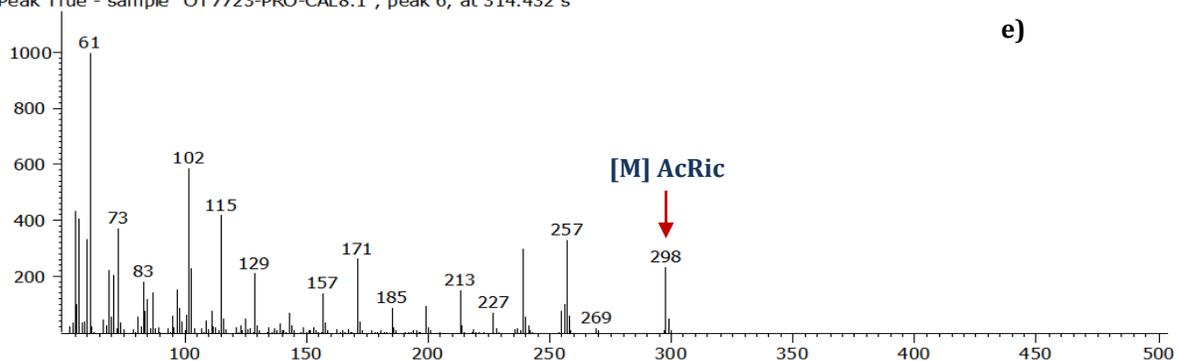


Peak True - sample "OT7722-PRO-CUT21:1", peak 10, at 339.497 s





Peak True - sample "OT7723-PRO-CAL8:1", peak 6, at 314.432 s



Peak True - sample "OT7723-PRO-CAL8:1", peak 7, at 338.232 s

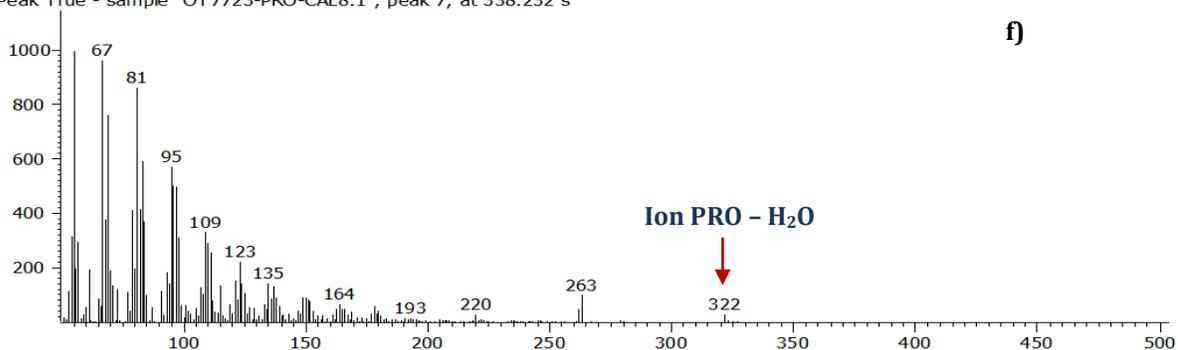


Figura 26. Espectros de ESI-MS de la hidrólisis de ricinoleato de propilo; a) Espectro de hidrólisis de PRO con Cut; b) Patrón de ionización del AcRiC, el ion molecular m/z 298 se observa a los 313 segundos; c) Patrón de ionización de PRO, el ion m/z 322 se observa a los 339 segundos; d) Espectro de hidrólisis de PRO con CAL-B; e) Patrón de ionización del AcRiC, el ion molecular m/z 298 se observa a los 314 segundos; f) Patrón de ionización de PRO, el ion m/z 322 se observa a los 338 segundos.

6.4 Reacciones de lipofilización

6.4.1 Transesterificación de cianidina-3-glucósido

La Cya-3-glu es una antocianina de tonalidad fucsia y se disuelve bien en isopropanol (**Figura 27a**). Para las reacciones se utilizó un extracto liofilizado con la AN5309 y la lipasa B de *C. antarctica* (CAL-B) inmovilizada, como enzima de comparación. Éstas se adicionaron a viales con la antocianina previamente disuelta en isopropanol y se añadió acetato de vinilo para iniciar la reacción. Las reacciones se dejaron correr durante 2 h. Al finalizar el tiempo de ensayo, los medios de reacción se habían decolorado apreciablemente, lo que indicó que hubo degradación de la antocianina (**Figura 27b**). El medio de reacción con el extracto cutinolítico mantuvo un ligero tono rosa, por lo que se corrió la muestra por HPLC para comprobar si hubo formación de un producto esterificado. Los resultados de la cromatografía mostraron dos picos de absorción, el mayor a los 3.115 min y el menor a los 3.581 min (**Figura 28**). La Cya-3-glu tiene un tiempo de retención de 4.35 min (**ANEXO E**) y los productos esterificados de ésta poseen tiempos de retención mayores por la adición de grupos que le confieren mayor hidrofobicidad. Estos datos demuestran que la antocianina no se esterificó con el grupo acetato y que incluso se degradó, dado que no se observó el pico de absorción característico de la antocianina, sino que se observaron dos picos a menor tiempo; la degradación de la antocianina pudo deberse a la acción de otros compuestos presentes en el extracto liofilizado de la cutinasa.

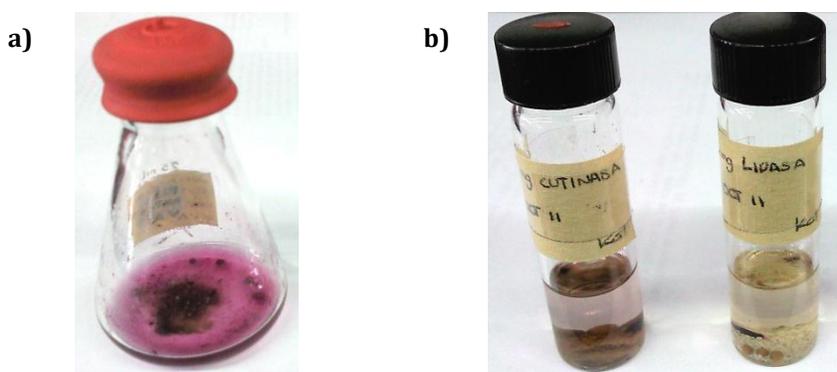


Figura 27. Reacción de transesterificación de la cianidina-3-glucósido; a) Ensayo cualitativo de disolución de la cianidina-3-glucósido en isopropanol; b) Medios de reacción con la cutinasa (izq.) y la lipasa B de *C. antartica* (CAL-B) (der.) tras 2 h de reacción. El medio se apreció descolorido, lo cual indicó que hubo degradación de la antocianina ya que no se hallaron rastros de ésta ni del producto esterificado en el análisis por HPLC.

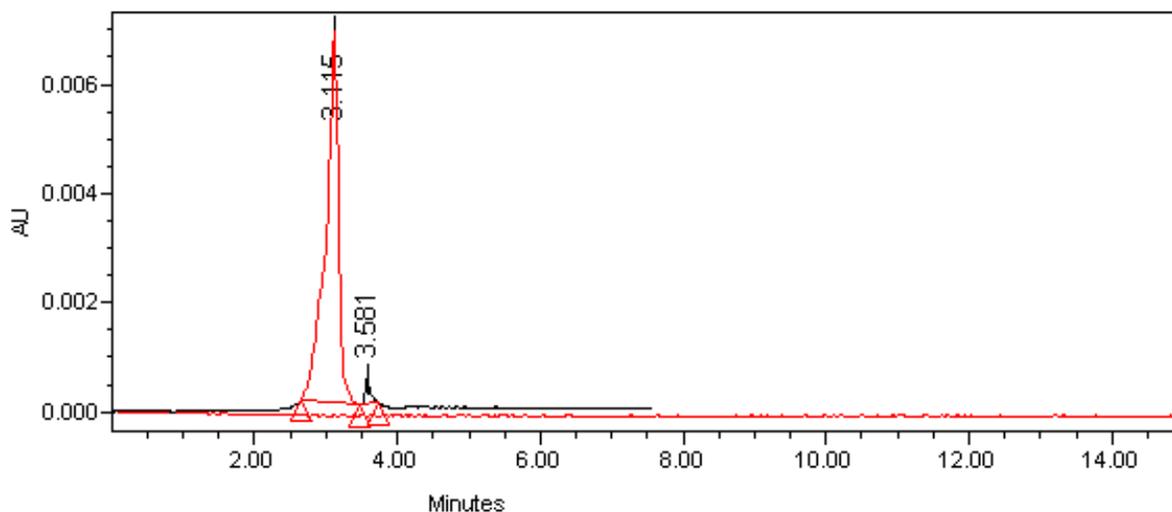


Figura 28. Cromatograma de la reacción de transesterificación de la cianidina-3-glucósido con el extracto liofilizado con la cutinasa. Se observaron dos picos a 3.115 y 3.581 min, respectivamente, los cuales no corresponden a los picos de absorción de la cianidina-3-glucósido (4.35 min) o del producto esterificado, el cual se esperaba que tuviera un tiempo de retención mayor al de la antocianina por el aumento de la hidrofobicidad en la molécula.

6.4.1 Transesterificación de cumarato de metilo con butanol

La reacción de transesterificación del cumarato de metilo (MCUM) con butanol se incubó con agitación durante cinco días y al término del periodo se corrieron placas de cromatografía en capa fina (CCF) reveladas con DPPH y sulfato cérico para comprobar la formación del cumarato de butilo (BCUM). En el primer carril de ambas placas se aplicó el control, MCUM, en el segundo carril se aplicaron el control + la reacción y en el tercer carril únicamente se aplicó la reacción. Las placas revelaron la presencia de una sola mancha en el primer carril, correspondiente al MCUM, y dos manchas en el segundo y tercer carril; en estos dos carriles la mancha intensa inferior corresponde al MCUM, con un R_f de 0.43, mientras que la pequeña mancha por encima del control se asoció con el BCUM, con un R_f de 0.53 (**Figura 29**). El control MCUM y los productos de reacción se analizaron por ESI-MS; en el espectro de la reacción se observó el pico base (de mayor abundancia) a los 8.83 min (**Figura 30a**), el cual corresponde al MCUM ($PM=178 \text{ g/mol}$) por comparación de su patrón de ionización (**Figura 30b**) con el espectro estándar del MCUM (**ANEXO F**); a los 10.55 min se observó un patrón de ionización similar al del MCUM, además de la presencia del ion molecular m/z 220, por lo que se asumió que éste correspondería al BCUM ($PM=220 \text{ g/mol}$) (**Figura 30c**). La abundancia relativa del MCUM (100%) y del BCUM (aprox. 5%) que se aprecia en el espectro de la reacción (a los 8.83 y 10.68 min respectivamente) concuerda con lo que se observó en las placas de CCF, donde el MCUM permaneció el compuesto de mayor abundancia tras los cinco días de reacción, y sólo una pequeña parte de éste se había transesterificado para formar el compuesto de mayor

hidrofobicidad, el BCUM, sin embargo, el extracto enzimático de la cutinasa mostró que puede llevar a cabo este tipo de reacción, la cual se reporta típicamente con lipasas. De esta manera, se puede sugerir un potencial de aplicación novedoso para este tipo de enzimas en el área de producción de antioxidantes, ya sea en la síntesis de moléculas más lipofílicas o incluso en la reacción inversa, hidrólisis de moléculas para mejorar su capacidad antioxidante.

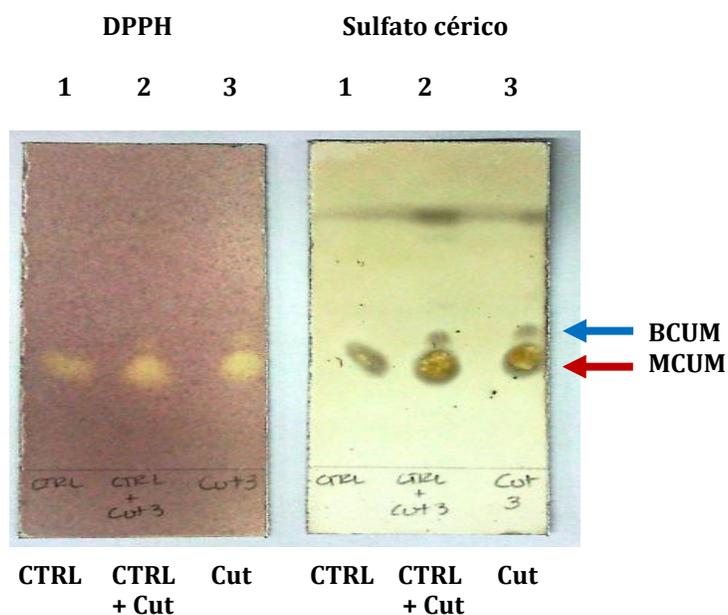


Figura 29. Cromatografía en capa fina de los productos de reacción de la transesterificación de cumarato de metilo (MCUM) a cumarato de butilo (BCUM). Carril 1: control (CTRL) equivalente a MCUM puro, carril 2: control más la reacción de transesterificación con la cutinasa (CTRL + Cut), carril 3: reacción de transesterificación con la cutinasa (Cut). Tras cinco días de reacción se observaron dos manchas en los carriles de la reacción con la cutinasa (carriles 3), que indican la presencia del sustrato MCUM y del producto esperado, BCUM.

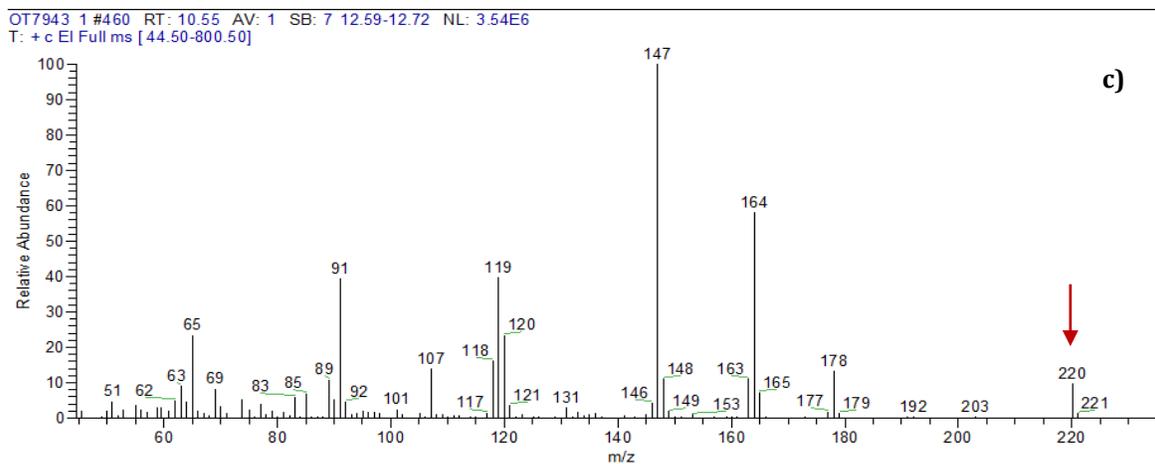
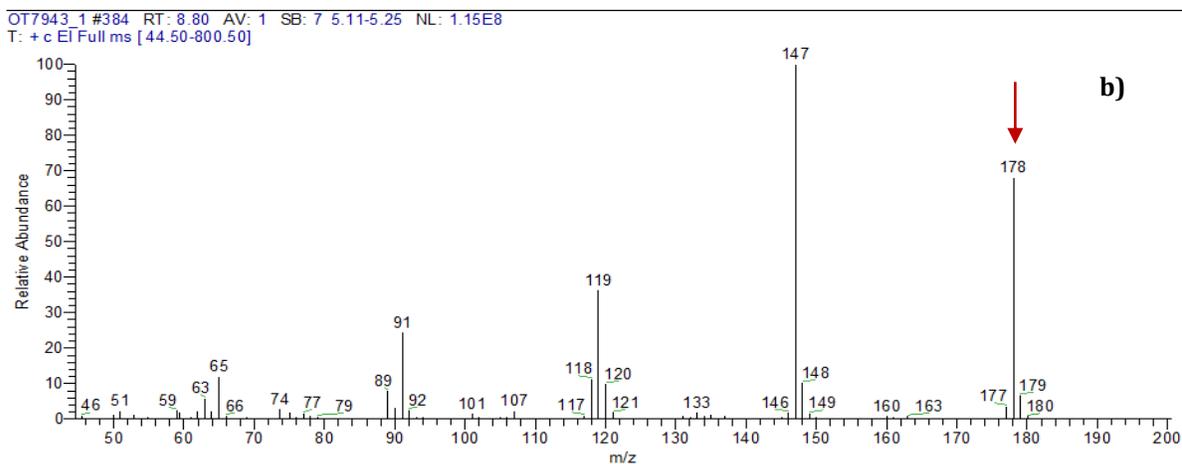
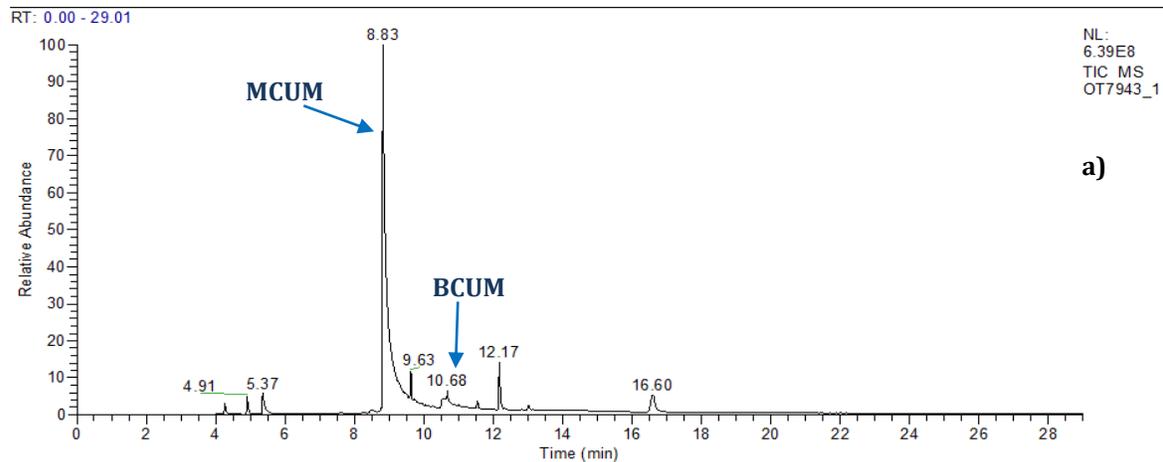


Figura 30. Espectros de ESI-MS de la reacción de transesterificación de MCUM a BCUM; a) Espectro general de la reacción, a los 8.83 min se encuentra el pico base que pertenece al MCUM y a 10.68 min se encuentra el pico que pertenece al BCUM; b) Patrón de ionización del MCUM, el ion molecular m/z 178 se señala con una flecha; c) Patrón de ionización del BCUM, el ion molecular m/z 220 se señala con una flecha.

7. CONCLUSIONES

La presencia de cutícula de manzana en el medio de cultivo induce dos cutinasas, la AN7541 (29 kDa) y la AN5309 (21 kDa), por lo que fue necesario adicionar otra fuente de carbono para regular la producción de la AN5309.

Las fermentaciones con cutícula y diferentes fuentes de carbono demostraron que la inducción de las cutinasas AN7541 y AN5309 se reprime si se utiliza glucosa como fuente de carbono adicional, ya que la actividad enzimática del extracto baja considerablemente. Por el contrario, el empleo de glicerol como fuente de carbono adicional favorece la presencia de la AN5309 por sobre la AN7541 en el extracto crudo, por lo que la actividad enzimática evaluada se atribuyó mayormente a la cutinasa AN5309.

Las condiciones óptimas de producción del extracto crudo con actividad de la cutinasa de 21 kDa fueron las siguientes:

- 48 h de fermentación
- 200 mg de cutícula, 300 rpm de agitación orbital y 37°C de temperatura de incubación
- Glicerol al 0.5% como fuente de carbono adicional a la cutícula de manzana

La enzima de 21 kDa inducida con cutícula de manzana en las condiciones establecidas se confirmó que corresponde a una de las 4 cutinasas reportadas para *A. nidulans*, la **cutinasa AN5309**. Ésta posee el pentapéptido consenso (-G-X-S-X-G-) y la triada catalítica (Ser-His-Asp) característicos de las lipasas, además de presentar tres puentes disulfuro hipotéticos.

El extracto crudo con actividad de la cutinasa AN5309 mostró un pH óptimo alcalino, ya que presentó mayor actividad en el rango de **pH 8-10**, siendo su pH óptimo de reacción **pH 9**. En cuanto a su estabilidad, el extracto retuvo actividad apreciable a todos los pH de ensayo tras 24 h de incubación a temperatura ambiente y de 4°C.

En cuanto a su comportamiento con la **temperatura**, el extracto con cutinasa demostró tener mayor actividad, tanto de reacción como de estabilidad, a **30°C**, aunque retiene hasta 80% de actividad a **50°C**, lo que demuestra termoestabilidad debido a la probable existencia de tres puentes disulfuro en su estructura, de acuerdo al número de cisteínas en su secuencia y a su homología con la cutinasa de *A. oryzae*.

La mayor especificidad por el **sustrato** se observó para ácidos grasos de **cadena media**, de 8 a 12 carbonos, a pesar de que se clasifica como una enzima que actúa sobre un sustrato natural de cadenas más largas, de 16 a 18 carbonos. Esto puede deberse a que la AN5309 presente en el extracto no posee una cavidad catalítica que le facilite acomodar sustratos de gran tamaño.

Con respecto a la estabilidad en **solventes**, el extracto con la cutinasa mostró afinidad por solventes polares y fue mayormente estable en una mezcla de **etanol-glicerol 50:50**, siendo que

retuvo hasta 65% de su actividad tras cuatro días de incubación; el extracto también fue estable en los solventes DMSO y tert-butanol, aunque en menor medida, y se inactiva totalmente en dioxano, ya que éste interfiere en las interacciones hidrofóbicas de las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas.

Los ensayos cutinolíticos mostraron que el extracto crudo con la AN5309 no hidrolizó la **cutina** bajo las condiciones empleadas. Sin embargo, hidrolizó un sustrato similar de menor complejidad, el **ricinoleato de propilo**. Debido a la existencia de otras cutinasas en *A. nidulans*, es posible que la AN5309 no sea la cutinasa encargada de degradar inicialmente a la cutina, sino que ésta podría inducirse por productos de degradación de menor tamaño o por otros componentes presentes en las cutículas de las plantas, como alcanos o alcoholes grasos de cadena media.

El extracto crudo liofilizado con la AN5309 no realizó la transesterificación de la cianidina-3-glucósido con acetato de vinilo, ya que el sustrato se degradó probablemente debido a algún componente presente en el extracto. En un segundo ensayo de lipofilización, el extracto realizó la **transesterificación** del antioxidante **cumarato de metilo** en **cumarato de butilo**. Esto es de interés ya que la lipofilización de antioxidantes típicamente se reporta con lipasas como la CAL-B, por lo que este resultado representa una aplicación potencial para las cutinasas.

La actividad de esterasa sobre *p*-nitrofenil ésteres evaluada en los extractos crudos se atribuyó a una cutinasa, la AN5309, la cual mostró características particulares de cutinasas y mostró algunas propiedades semejantes con la cutinasa AN7541. Sin embargo, la especificidad de sustrato del extracto con la AN5309 y la especificidad de la AN7541 es notablemente diferente y se refuerza con la capacidad que mostraron ambas para poder hidrolizar la cutina. Esto puede llevar a sugerir que cada una de ellas cumple una función distinta en términos de degradación de sustratos para *A. nidulans*, y desde el punto de vista industrial, se pueden explotar para diferentes propósitos, como en la síntesis de ésteres aromáticos con la AN5309, o hidrólisis de aceites con la AN7541.

8. PERSPECTIVAS

Con este trabajo se logró confirmar la naturaleza de la enzima de estudio, optimizar las condiciones de producción para obtener un extracto que contuviera la actividad cutinolítica deseada e identificar posibles características estructurales de la proteína, además de evaluar algunas de sus características de reacción y ensayar un par de aplicaciones en biocatálisis. Sin embargo, estas pruebas se realizaron con un extracto crudo concentrado, por lo que a continuación se plantean algunos puntos de interés para profundizar en el conocimiento de la cutinasa AN5309:

- Realizar un estudio más profundo sobre la regulación de cutinasas en *A. nidulans*.
- Purificar la enzima para poder llevar a cabo una caracterización bioquímica más fina y así conocer si existen diferencias significativas con la caracterización del extracto crudo cutinolítico, que podría contener trazas de otras enzimas con actividad de estererasas.
- Realizar ensayos de inmovilización para conocer su potencial biocatalítico y poder facilitar la recuperación y reutilización de la enzima, y así aumentar los rendimientos de las reacciones.
- Ensayar la reacción de transesterificación de la cianidina-3-glucósido con la cutinasa AN5309 pura para discernir si la enzima efectivamente no es capaz de realizar esta reacción o se vio obstaculizada por componentes del extracto crudo.
- Optimizar las condiciones de reacción del extracto con la AN5309 para lograr un mayor rendimiento de la transesterificación del cumarato de metilo en cumarato de butilo y otras reacciones de lipofilización de antioxidantes.
- Continuar la búsqueda de aplicaciones, como la síntesis e hidrólisis de otros ésteres, que puedan ser de utilidad industrial, en base a las propiedades mostradas por el extracto crudo o por la cutinasa pura.

9. REFERENCIAS

- Abu Bakar FD, Murad AMA, Hamidi AA, Zamrod Z, Mahadi NM y P Sullivan. (2005). Induction and expression of cutinase activity during saprophytic growth of the fungal plant pathogen, *Glomerella cingulata*. *Asia Pac J Mol Biol Biotech* 13(2):63-69.
- Agrawal PB, Nierstrasz VA, Bouwhuis GH y MMCG Warmoeskerken. (2008). Cutinase and pectinase in cotton bioscouring: an innovative and fast bioscouring process. *Biocatal Biotransform* 26(5):412-421.
- Andersen A, Svendsen A, Vind J, Lassen SF, Hjort C, Borch K y SA Patkar. (2002). Studies on ferulic acid esterase activity in fungal lipases and cutinases. *Coll Surf B, Biointerfaces* 26:47-55.
- Badenes SM, Lemos F y JMS Cabral. (2010). Transesterification of oil mixtures catalyzed by microencapsulated cutinase in reversed micelles. *Biotechnol Lett* 32(3):399-403
- Baker SE, Thykaer J, Adney WS, Brettin TS, Brockman FJ, D'Haeseleer P, Martinez AD, Miller RM, Rokhsar DS, Schadt CW, Torok T, Tuskan G, Bennett J, Berka RM, Briggs SP, Heitman J, Taylor J, Turgeon BG, Werner-Washburne M y ME Himmel. (2008). Fungal genome sequencing and bioenergy. *Fungal Biol Rev* 22, 1-5.
- Bauer S, Vasu P, Staffan Persson S, Mort AJ y CR Somerville. (2006). Development and application of a suite of polysaccharide degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(30):11417-11422.
- Bengoechea L, Hernández T, Quesada C, Bartolomé B, Estrella I y C Gómez-Cordovés. (1995). Structure of hydroxycinnamic acid derivatives established by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Chromatographia* 41(1-2):94-98.
- Bennett JW. (2010). An overview of the genus *Aspergillus* en: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press. p 1-17.
- Berka RM, Yoder W, Takagi S y KC Boominathan. (1995). *Aspergillus* expression system. United States Patent 5,667,990.
- Bermúdez-García EP. (2010). Modificación enzimática de flavonoides con las carboxilesterasas de *Bacillus pumilus* GMA1. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Bommarius A y BR Riebel. (2004). *Biocatalysis*. Wiley - VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim. p 1-15, 30-32, 339-341.

- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Carneiro-da-Cunha MG, Melo EP, Sebastiao MJ, Aires-Barros MR y JMS Cabral. (1996). Separation and purification of lipases by liquid-liquid extraction processes. *Engineering of/with lipases*, p 551-576.
- Carvalho CML, Aires-Barros MR y JMS Cabral. (1999). Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnol Bioeng* 66:17-34.
- Carvalho CML, Aires-Barros MR y JMS Cabral. (1998a). Cutinase structure, function and biocatalytic applications. *Electron J Biotechnol* 1:160-173.
- Carvalho CML, Aires-Barros MR y JMS Cabral. (1998b). *Fusarium solani* cutinase in reversed micelles: stabilisation strategies and operational stability. *Enzyme stabilisation: Methods & Applications*, p 32.
- Carvalho CML, Serralheiro MLM, Cabral JMS y MR Aires-Barros. (1997). Application of factorial design to the study of transesterification reactions using cutinase in AOT-reversed micelles. *Enz Microb Technol* 21:117-123.
- Casado CG y A Heredia. (1999). Structure and dynamics of reconstituted cuticular waxes of grape berry cuticle (*Vitis vinifera* L.). *J Exp Bot* 50:175-182.
- Castro-Ochoa LD, Peña-Montes C, González-Canto A, Alva-Gasca A, Esquivel-Bautista R, Navarro-Ocaña A, y A Farrés-González Sarabia. (2012). AN CUT2, an extracellular cutinase from *Aspergillus nidulans* induced by olive oil. *Appl Biochem Biotechnol* 166(5):1275-90.
- Castro-Ochoa LD, Peña-Montes C, y A Farrés-González Sarabia. (2010). Producción y características de cutinasas: una alternativa interesante para biocatálisis a nivel industrial. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 13(1):16-20.
- Castro IM y MC Loureiro-Dias. (1991). Glycerol utilization in *Fusarium oxysporum* var. *lini*: regulation of transport and metabolism. *J Gen Microbiol* 137:1497-1502.
- Chahinian H y L Sarda. (2009). Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. *Prot Pept Lett* 16: 1149-1161.
- Chebil L, Humeau C, Falcimaigne A, Engasser J-M y M Ghouil. (2006). Enzymatic acylation of flavonoides. *Proc Biochem* 41:2237-2251.
- Chen S, Tong X, Woodward RW, Du G, Wu J y Chen J. (2008). Identification and characterization of bacterial cutinase. *J Biol Chem* 283:25854-25862.

- Cortés GA, Salinas MY, San Martín-Martínez E y F Martínez-Bustos. (2006). Stability of anthocyanins of blue maize (*Zea mays* L.) after nixtamalization of separated pericarp-germ tip cap and endosperm fractions. *J Cereal Sci* 43:57-62.
- Creveld LD, Meijberg W, Berendsen HJC y HAM Pepermans. (2001). DSC studies of *Fusarium solani pisi* cutinase: consequences for stability in the presence of surfactants. *Biophys Chem* 92:65-75.
- Croteau R y PE Kolattukudy. (1974). Direct evidence for the involvement of epoxide intermediates in the biosynthesis of the cl, family of cutin acids. *Arch Biochem Biophys* 162:471-480.
- Cunnah PJ, Aires-Barros MR, Cabral JMS. (1996). Esterification and transesterification catalysed by cutinase in reverse micelles of CTAB for the synthesis of short chain esters. *Biocatal Biotrans* 14:125-146.
- Cygler M y JD Schrag. (1997). Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. *Meth Enzymol* 284:3-27.
- Da Silva MAM, Medeiros VC, Langone MAP y DMG Freire. (2003). Synthesis of monocaprin catalyzed by lipase. *Appl Biochem Biotechnol* (108)1-3:757-768.
- David H, Özçelik IS, Hofmann G y J Nielsen. (2008). Analysis of *Aspergillus nidulans* metabolism at the genome-scale. *BMC Genomics* 9:163.
- Deas AHB, Baker EA y PJ Holloway. (1974). Identification of 16-hydroxyoxohexadecanoic acid monomers in plant cutins. *Phytochem* 13:1901-1905.
- Derewenda ZS, Derewenda U y GG Dodson. (1992). The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* 227:818-839.
- de Barros DPC, Fonseca LP, Fernandes P, Cabral JMS y L Mojovic. (2009). Biosynthesis of ethyl caproate and other short ethyl esters catalyzed by cutinase in organic solvent. *J Mol Catal* 60:178-185.
- de Barros DPC, Fonseca LP, Fernandes P, Cabral JMS y LP Fonseca. (2010). Operational stability of cutinase in organic solvent system: model esterification of alkyl esters. *Chem Technol Biotechnol* 85(12):1553-1560.
- de Barros DPC, Fonseca LP, Fernandes P, Cabral JMS y LP Fonseca. (2011). Synthetic application and activity of cutinase in an aqueous, miniemulsion model system: Hexyl octanoate synthesis. *Catal Today* 173(1):95-102.

- Donelli I, Taddei P, Smet PF, Poelman D, Nierstrasz VA y F Giuliano. (2009). Enzymatic surface modification and functionalization of PET: A water contact angle, FTIR, and fluorescence spectroscopy study. *Biotechnol Bioeng* 103(5):845-856.
- Dutta K, Sen S y VD Veeranki. (2009). Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Proc Biochem* 44:127-134.
- Egmond MR y CJ van Bommel. (1997). Impact of structural information on understanding lipolytic function. *Methods in Enzymology*, vol 284, p 119-129.
- Egmond MR y J de Vlieg. (2000). *Fusarium solani pisi* cutinase. *Biochimie* 82:1015-1021.
- Eisbond LS, Reynertson KA, Luo X-D, Basile MJ y EJ Kennelly. (2004). Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chem* 84:23-28.
- Ejima K, Liu J, Oshima Y, Hirooka Z, Shimanuki S, Yokota Y, Hemmi H, Nakayama T y T Nishino. (2004). Molecular cloning and characterization of a thermostable carboxylesterase from an archaeon *Sulfolobus shibatae* DSM5389; non-linear kinetic behavior of a hormone-sensitive lipase family enzyme. *J Biosci Bioeng* 98(6)445-451.
- Esquivel-Bautista R. (2011). Producción regioselectiva de 7-O-lauroilo de ácido kójico por carboxilesterasas. Tesis Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Ferguson LR, Shuo-tun Z y PJ Harris. (2005). Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29. *Mol Nut Food Res* 49(6):585-693.
- Fett WF, Wijey C, Moreau RA y SF Osman. (1999). Production of cutinase by *Thermomonospora fusca* ATCC 27730. *J Appl Microbiol* 86:561-8.
- Fett WF, Wijey C, Moreau RA y SF Osman. (2000). Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria. *Lett Appl Microbiol* 31:25-9.
- Figueroa-Espinoza MC y P Villeneuve. (2005). Phenolic acids enzymatic lipophilization. *J Agric Food Chem* 53(8):2779-87.
- Flipsen JAC, van der Hijden HTWM, Egmond MR y HM Verheij. (1996). Action of cutinase at the triolein-water interface. Characterisation of interfacial effects during lipid hydrolysis using the oil-drop tensiometer as a tool to lipase kinetics. *Chem Phys Lipids* 84:105-115.
- Fontes N, Almeida MC, Peres C, Garcia S, Grave J, Aires-Barros MR, Soares CM, Cabral JMS, Maycock CD y S Barreiros. (1998). Cutinase activity and enantioselectivity in supercritical fluids. *Ind Eng Chem Res* 37:3189-3194.

- Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglou S, Lee SI, Bastürkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V, Jurka J, Scazzocchio C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D'Enfert C, Bouchier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M, Selker EU, Archer DB, Peñalva MA, Oakley BR, Momany M, Tanaka T, Kumagai T, Asai K, Machida M, Nierman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fischer R, Miller B, Dyer P, Sachs MS, Osmani SA y BW Birren. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438(7071):1105-15.
- Geiser DM, Samson RA, Varga J, Rokas A y Witiak SM. (2008). A review of molecular phylogenetics in *Aspergillus*, and prospects for a robust genus-wide phylogeny. *Aspergillus* in the Genomic Era, p 17–32.
- Genencor. (1988). Increasing pharmacological effect of agricultural chemicals. U.S: Patent 88-08945.
- Gevens A y RL Nicholson. (2000). Cutin Composition: A Subtle Role For Fungal Cutinase? *Phys Mol Plant Pathol* 57:43-45.
- Godfrey T y S West. (1996). *Industrial Enzymology*, 2da ed. New York: Stockton Press.
- Goldman GH y Osmani SA. (2008). *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology and Research Methods*. CRC Press.
- Gonçalves APV, Lopes JM, Lemos F, Ramôa F, Prazeres, DMF, Cabral JMS y MR Aires-Barros (1997). Effect of the immobilization support on the hydrolytic activity of a cutinase from *Fusarium solani pisi*. *Enz Microb Technol* 20:93-101.
- Gonçalves AM, Schacht E, Matthijs G, Aires-Barros MR, Cabral JMS y MH Gil. (1999). Stability studies of a recombinant cutinase immobilized to dextran and derivatized silica supports. *Enz Microb Technol* 24: 60–66.
- Gonçalves APV, Cabral JMS y MR Aires-Barros. (1995). Immobilization of a recombinant cutinase by entrapment and by covalent binding. *Appl Biochem Biotechnol* 60:217–228.
- Gonçalves APV, Lopes JM, Lemos F, Prazeres DMF, Cabral JMS, Aires- Barros MR. (1996a). On the importance of the support material for the hydrolysis of triglycerides with a recombinant cutinase. Proceedings of the III Congreso Ibérico de Biotecnología. Valladolid, Spain, p 217-220.
- Gonçalves APV, Lopes JM, Lemos F, Ramoa Ribeiro F, Prazeres DMF, Cabral JMS, Aires-Barros MR. (1996b). Zeolites as supports for enzymatic hydrolysis reactions. Comparative study of several zeolites. *J Mol Catal B Enzymat* 1:53–60.

- Guo BZ, Russin JS, Cleveland TE, Brown R y KE Damann. (1996). Evidence for cutinase production by *Aspergillus flavus* and its possible role in infection of corn kernels. *Phytopathol* 86: 824-829.
- Heredia A. (2002). Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim Biophys Acta* 1620: 1-7.
- Hiscock SJ, Dewey FM, Coleman JOD y HG Dickinson. (1994). Identification and localization of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus* L. *Planta* 193:377-384.
- Holloway P. (1973). Cutins of *Malus pumila* fruits and leaves. *Phytochem* 12:2913-2920.
- Horbowicz M. (2008). Anthocyanins of fruits and vegetables, their occurrence, analysis and role in human nutrition. *Veg Crops Res Bull* 68:5-22.
- Hunsen M, Azim A, Xie W y R Gross. (2008). A *Humicola insolens* cutinase-catalyzed lactone ring-opening polymerizations: kinetics and mechanistic studies. *Biomacromol* 9:518-522.
- Illanes A. (2008). Enzyme Biocatalysis: Principles and applications p 1-38 y 292-307.
- Jaeger KE, Dijkstra BW y MT Reetz. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, threedimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 53:315-351.
- Käfer E. (1977). Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and chromosomal aberrations. *Adv Genet* 19:33-131.
- Käfer E y TW Hill. (2001). Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Newsletter* 48:20-21.
- Kai AJ. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J Biochem* 88:1895-1898.
- Karpushova A, Brümmer F, Barth S, Lange S y RD Schmid. (2005). Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of novel esterases from *Bacillus* sp. associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:59-69.
- Kim Y, Jeewon L y M Seung-Hyeon. (2003). Uniqueness of microbial cutinases in hydrolysis of *p*-nitrophenyl esters. *J Microbiol Biotech* 13(1):57-63.
- Kim YH, Ahn JY, Moon SH y J Lee. (2005). Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide, malathion, by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase. *Chemosphere* 60:1349-1355.

- Kodama Y, Masaki K, Kondo H, Suzuki M, Tsuda S, Nagura T, Shimba N, Suzuki E y H Iefuji. (2009). Crystal structure and enhanced activity of a cutinase-like enzyme from *Cryptococcus* sp. strain S-2. *Proteins* 77:710–717.
- Kolattukudy PE. (1970). Biosynthesis of a lipid polymer, cutin: the structural component of plant cuticle. *Biochem Biophys Res* 41:299-305.
- Kotsakis P y NJ Parry. (2010). Sequential enzyme delivery system. United States Patent 20100206013.
- Kyte J y RF Doolittle. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157(1):105-32.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lauwereys M, De Geus P, De Meutter J, Stanssens P y G Mathysens. (1991). Cloning, expression and characterization of cutinase, a fungal lipolytic enzyme. *Chimie V*, editor. *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*. p 243–251.
- Li D, Sirakova T, Rogers L, Ettinger WF y PE Kolattukudy PE. (2002). Regulation of constitutively expressed and induced cutinase genes by different zinc finger transcription factors in *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*). *J Biol Chem* 277(10):7905-12.
- Lin TS y PE Kolattukudy. (1980a). Isolation and characterization of a cuticular polyester (cutin) hydrolyzing enzyme from phytopathogenic fungi. *Phys Plant Pathol* 17:1-15.
- Lin TS y PE Kolattukudy. (1980b). Structural studies on cutinase, a glycoprotein containing novel amino acids and glucuronic acid amide at the N terminus. *Eur J Biochem* 106:341-351.
- Liu L, Gosser Y, Baker PJ, Ravee Y, Lu Z, Alemu G, Li H, Butterfoss GL, Kong X, Gross R y JK Montclare. (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(43):15711–15716.
- Longhi S y C Cambillau. (1996). Dynamics of *Fusarium solani* cutinase investigated through structural comparison among different crystal forms of its variants. *Proteins* 26: 442-458.
- Longhi S y C Cambillau. (1999). Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1441:85–196.
- MacCabe AP, Orejas M, Tamayo EN, Villanueva A y D Ramón. (2002). Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. *J Biotechnol* 96:43–54.

- Maeda H, Yamagata Y, Abe K, Hasegawa F, Machida M, Ishioka R, Gomi K y T Nakajima. (2005). Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 778–788.
- Maiti IB, Kolattukudy PE, Shaykh M. (1979). Purification and characterization of a novel cutinase from *Nasturtium (Tropaeolum majus)* pollen. *Arch Biochem Biophys* 196:412–23.
- Martinez C, Geus P, Lauwereys M, Matthyssens G y C Cambillau. (1992). *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature* 356:615–618.
- Martinez C, Nicolas A, van Tilbeurgh H, Egloff MP, Cudrey C, Verger R y C Cambillau. (1994). Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole. *Biochem* 33:83–89.
- Matak MY y ME Moghaddam. (2009). The role of short-range Cys171–Cys178 disulfide bond in maintaining cutinase active site integrity: A molecular dynamics simulation. *Biochem Biophys Res Commun* 390:201–204.
- Melo EP, Aires-Barros MR, Cabral JMS. (1995). Triglyceride hydrolysis and stability of a recombinant cutinase from *Fusarium solani* in AOT–isooctane reversed micelles. *Appl Biochem Biotechnol* 50:45–56.
- Melo EP, Baptista RP y JMS Cabral. (2003). Improving cutinase stability in aqueous solution and in reverse micelles by media engineering. *J Mol Catal B: Enzymatic* 2: 299–306.
- Murphy CA, Cameron JA, Huang SJ y RT Vinopal. (1996). *Fusarium* polycaprolactone depolymerase is cutinase. *Appl Environ Microbiol* 62: 456–460.
- Nakajima N, Ishihara K, Itoh T, Furuya T y H Hamada. (1999). Lipase-catalyzed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments. *J Biosci Bioeng* 87(1):105-107.
- Nawani N, Singh R y J Kaur. (2006). Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electron J Biotechnol* 9:559-565.
- Neves-Petersen MT, Fojan P, y SB Petersen. (2001). How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *J Biotech* 85:115–147.
- Nyon MP, Rice DW, Berrisford JM, Hounslow AM, Moir AJG, Huang H, Nathan S, Mahadi NM, Abu Bakar FD y CJ Craven. (2009). Catalysis by *Glomerella cingulata* cutinase requires conformational cycling between the active and inactive states of its catalytic triad. *J Mol Biol* 385:226–235.

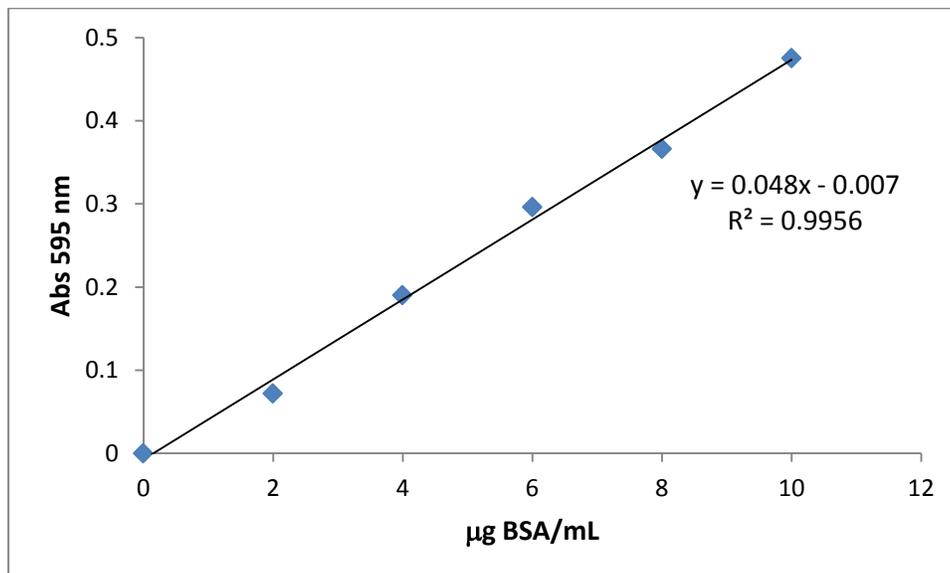
- Pacchiano RA, Sohn W, Chlanda VL, Garbow JR y RE Stark. (1993). Isolation and spectral characterization of plant cuticle polyesters. *J Agric Food Chem* 41:78–83.
- Papadimitriou V, Xenakis A, Cazianis CT, Stamatis H, Egmond M, Kolisis FN. (1996). EPR studies of cutinase in microemulsions. *Ann NY Acad Sci* 799:275–280.
- Peña-Montes C, González A, Castro-Ochoa LD y A Farrés. (2008). Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 78(4):603-12.
- Peña-Montes C. (2009). Análisis de la expresión y caracterización de la esterasa StcI involucrada en la biosíntesis de esterigmatocistina en *Aspergillus nidulans*. Tesis Doctorado en Ciencias. Facultad de Química. UNAM.
- Pio TF y GA Macedo. (2007). Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporium* using response surface methodology. *Enz Microb Technol* 41:613–9.
- Pocalyko DJ y M Tallman. (1998). Effects of amphipaths on the activity and stability of *Fusarium solani pisi* cutinase. *Enz Microb Technol* 22: 647-651.
- Poulouse AJ y PE Kolattukudy. (1988). Enzymes as agricultural chemical adjuvants. European Patent EP0272002.95.03.05.
- Purdy RE y PE Kolattukudy. (1975). Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, amino acid composition, and molecular weight of two isoenzymes of cutinase and a nonspecific esterase from *Fusarium solani f. pisi*. *Biochem* 14:2824–2831.
- Richmond DV y JT Martin. (1959). Studies on plant cuticle: the composition of the cuticle of apple leaves and fruits. *Ann Appl Biol* 47: 583–592.
- Sarkar S, Sreekanth B, Kant S, Banerjee R y BC Bhattacharyya. (1998). Production and optimization of microbial lipase. *Biopro Eng* 19:29-32.
- Sebastian, J y PE Kolattukudy. (1988). Purification and characterization of cutinase from a fluorescent *Pseudomonas putida* bacterial strain isolated from phyllosphere. *Arch Biochem Biophys* 263:77-85.
- Sebastião MJ, Cabral JMS y MR Aires-Barros. (1993). Synthesis of fatty acid esters by a recombinant cutinase in reversed micelles. *Biocatalysis in non-conventional media*, p 719–724.
- Segoviano-Reyes LM. (2012). Regulación de la producción de cutinasas en *Aspergillus nidulans*. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

- Sereti V, Stamatis H y FN Kolisis. (1997). Improved stability and reactivity of *Fusarium solani* cutinase in supercritical CO₂. *Biotechnol Tech* 11:661-665.
- Serralha FN, Lopes JM, Lemos F, Prazeres DMF, Aires-Barros MR Cabral JMS y FR Ribeiro. (1998). Zeolites as supports for an enzymatic alcoholysis reaction. *J Mol Catal B Enzymatic* 4:303-311.
- Sharma R, Chisti Y y UC Banerjee. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv* 19:627-662.
- Shimizu S, Ogawa J, Kobayashi K y M Kobayashi. (1997). Screening of novel microbial enzymes for the production of biologically and chemically useful compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 58:45-87.
- Shué M, Maurin D, Dhouib R, Bakala N'Goma J-C, Delorme V, Lambeau G, Carrière F y S Canaan. (2010). Two cutinase-like proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis* show very different lipolytic activities reflecting their physiological function. *The FASEB Journal* 24(6):1893-1903
- Sjursnes B, Valente C y P Halling. (1998). Interactions between water and medium effects on enzymes in organic media: kinetics of cutinase catalysed esterification with mutual solvation of reactants. *Biotechnol Bioeng* 1(3).
- Skamnioti P, Furlong RF y SJ Gurr. (2008). Evolutionary history of the ancient cutinase family in five filamentous Ascomycetes reveals differential gene duplications and losses and in *Magnaporthe grisea* shows evidence of sub- and neo-functionalization. *New Phytol* 180(3):711-21.
- Smith LC, Faustinella F y L Chan. (1992). Lipases: three-dimensional structure and mechanism of action. *Curr Opin Struct Biol* 2:490-496.
- Soliday CL y PE Kolattukudy. (1983). Primary structure of the active site region of fungal cutinase, an enzyme involved in phytopathogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 114:1017-1022.
- Speranza P, de Oliveira P y G Alves. (2011). Effects of different solid state fermentation substrate on biochemical properties of cutinase from *Fusarium* sp. *J Mol Catal B: Enzymatic* 72:181- 186.
- Stamatis, H, Sereti V y FN Kolisis. (2001). Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *J Mol Catal B: Enzymatic* 11:323-328.

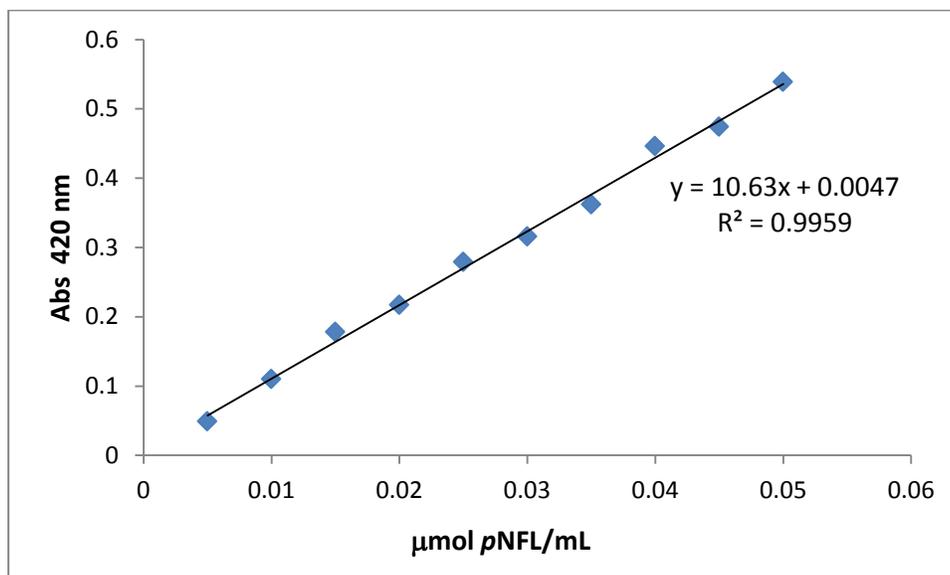
- Stevenson DE, Wibisono R, Jensen DJ, Stanley RA y JM Cooney. (2006). Direct acylation of flavonoid glycosides with phenolic acids catalysed by *Candida antárctica* lipase B (Novozym 435). *Enz MicrobTechnol* 39:1236-1241.
- Tobert JA. (2003). Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2:517-26.
- Trail F y W Koller. (1990). Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi evidence for a relationship between enzyme properties and tissue specificity. *Physiol Mol Plant Pathol* 36:495-508.
- Trail F y W Koller. (1993). Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: purification characterization of two cutinases from *Alternaria brassicicola*. *Physiol Mol Plant Pathol* 42:205-20.
- Tsuchiyama M, Sakamoto T, Tanimori S, Murata S y H Kawasaki. (2007). Enzymatic synthesis of hydroxycinnamic acid glycerol esters using type A feruloyl esterase from *Aspergillus niger*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71(10):2606-2609.
- Vafiadi C, Topakas E, Alissandratos A, Faulds CB y P Christakopoulos. (2008). Enzymatic synthesis of butyl hydroxycinnamates and their inhibitory effects on LDL-oxidation. *J Biotechnol* 133:497-504.
- van Gemeren IA, Beijersbergen A, van den Hondel CAMJJ y CT Verrips. (1998). Expression and secretion of defined cutinase variants by *Aspergillus awamori*. *Appl Environ Microbiol* 64(8):2794.
- Vergara-Barroso P. (2010). Inmovilización de esterasas a partir de un extracto crudo de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis Maestría en Ciencias. Facultad de Química, UNAM.
- Vogg G, Fischer S, Leide J, Emmanuel E, Jetter R, Levy AA y M Riederer. (2004). Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid ω -ketoacyl-CoA synthase. *J Exp Bot* 55(401):1401-1410.
- Vulfson EN, Halling PJ y HL Holland. (2001). Enzymes in Nonaqueous Solvents. Humana Press p 1-13.
- Wang G, Michailides TJ, Hammock BD, Lee Y y RM Bostock. (2000). Affinity purification and characterization of a cutinase from the fungal plant pathogen *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey. *Arch Biochem Biophys* 382(1):31-38.
- Winkler FK, D'arcy A y W Hunziker. (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 343: 771-774.

-
- **Aspergillus Genome Database**
www.aspgd.org/cache/A_nidulans_FGSC_A4_genomeSnapshot.html
 - **Aspergillus Comparative Database**
www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/
 - **BLAST** blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
 - **UniProtKB** www.uniprot.org/help/uniprotkb
 - **SignalP 4.0 Server** www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
 - **ProtParam** web.expasy.org/protparam/
 - **NetNGlyc 1.0 Server** www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/
 - **ClustalW** www.genome.jp/tools/clustalw/
 - **Jpred 3** www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/
 - **M4T Server 3.0** manaslu.aecom.yu.edu/M4T/
 - **PyMOL** www.pymol.org

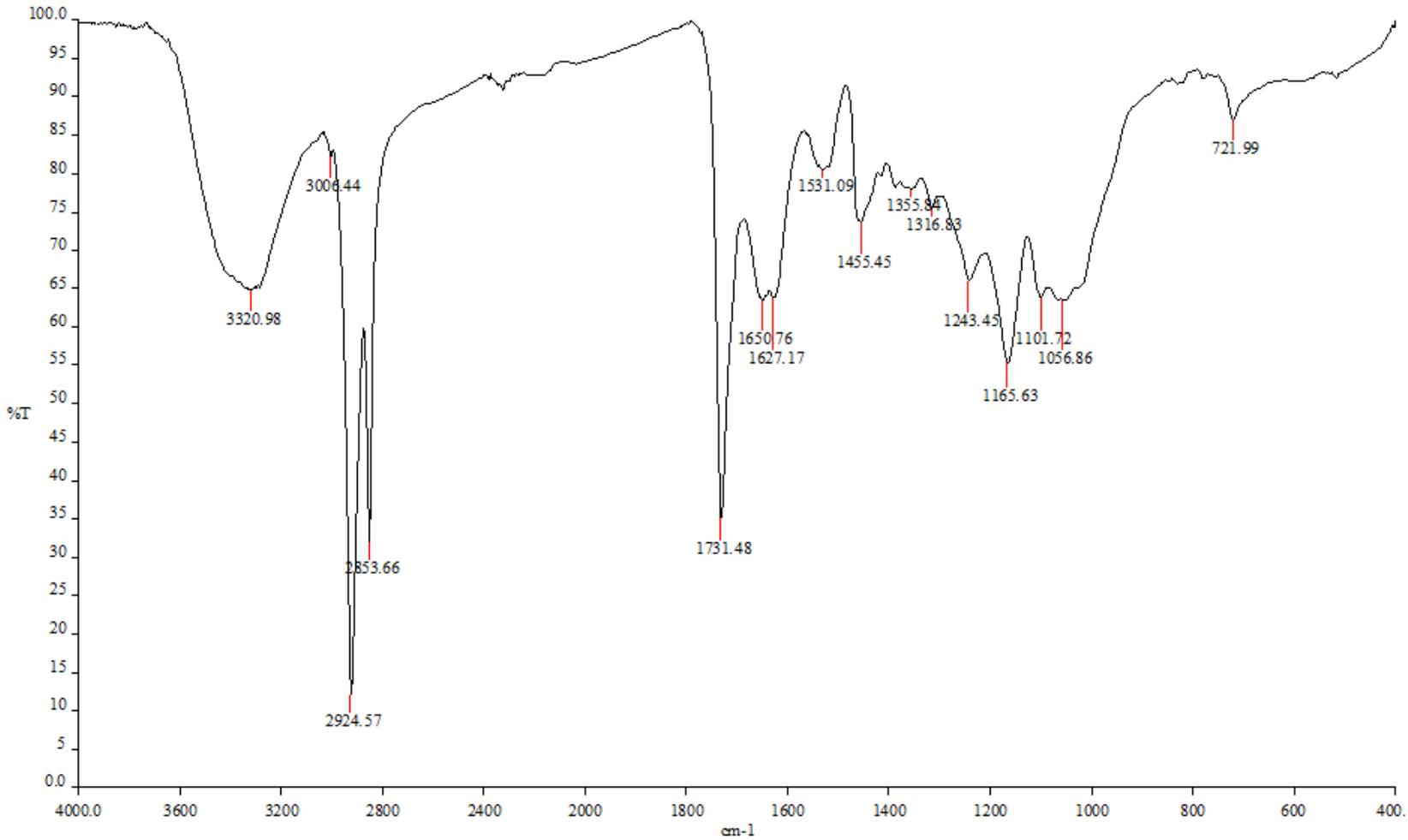
ANEXO A. Curva patrón de Bradford para cuantificar la concentración de proteína



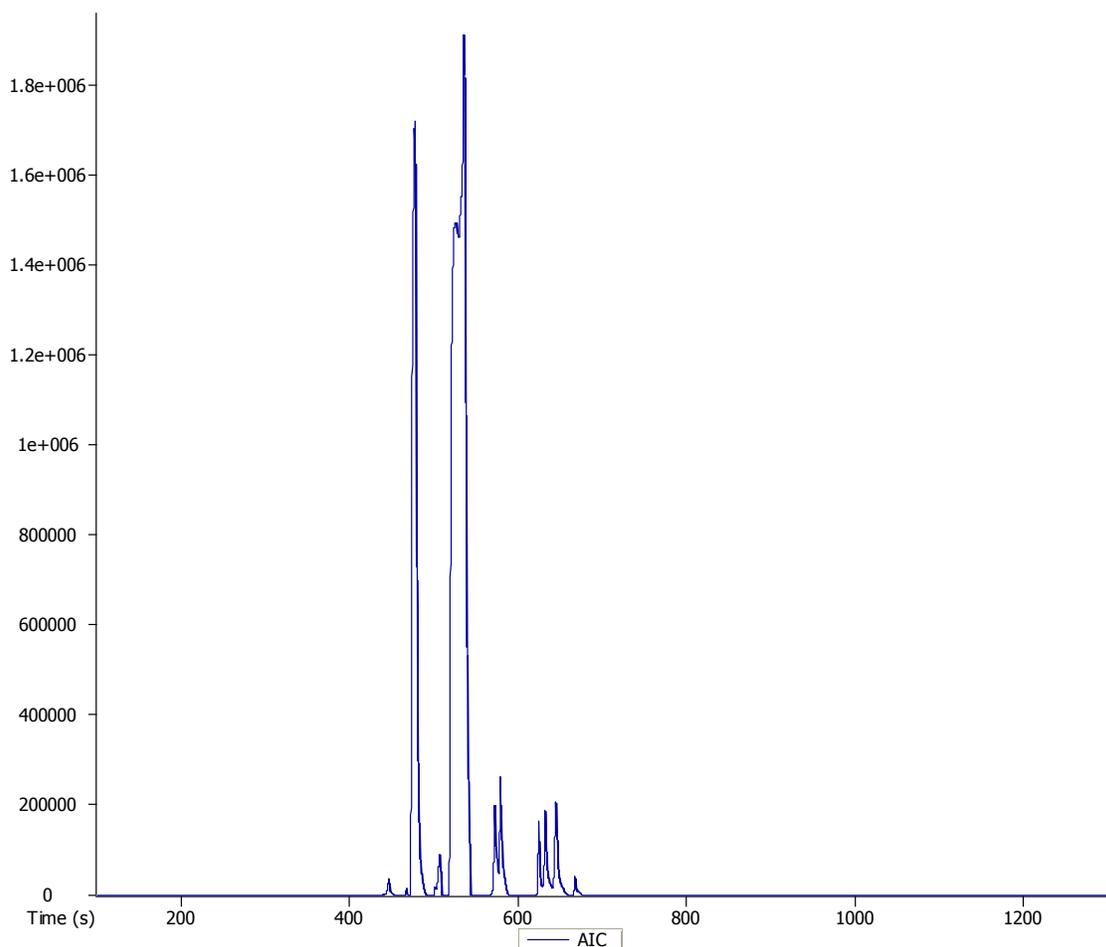
ANEXO B. Curva patrón de pNFL para la determinación de actividad esterasa



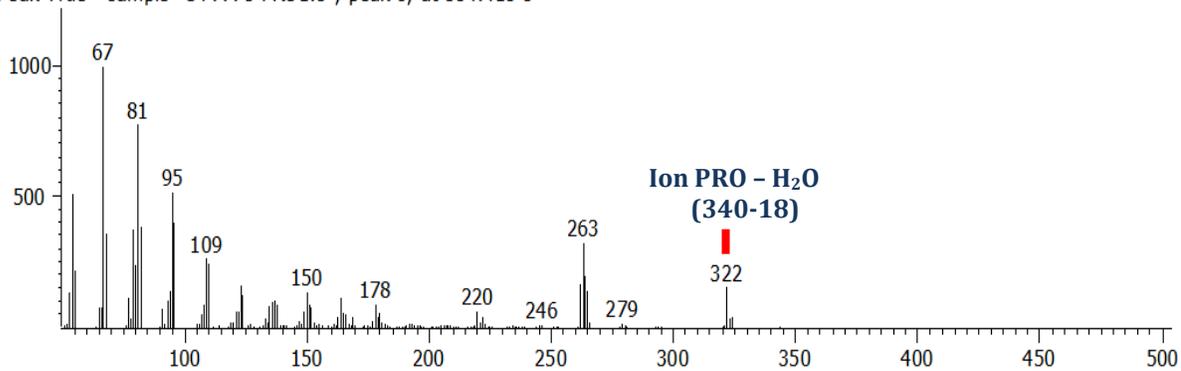
ANEXO C. Espectro infrarrojo de cutina pura



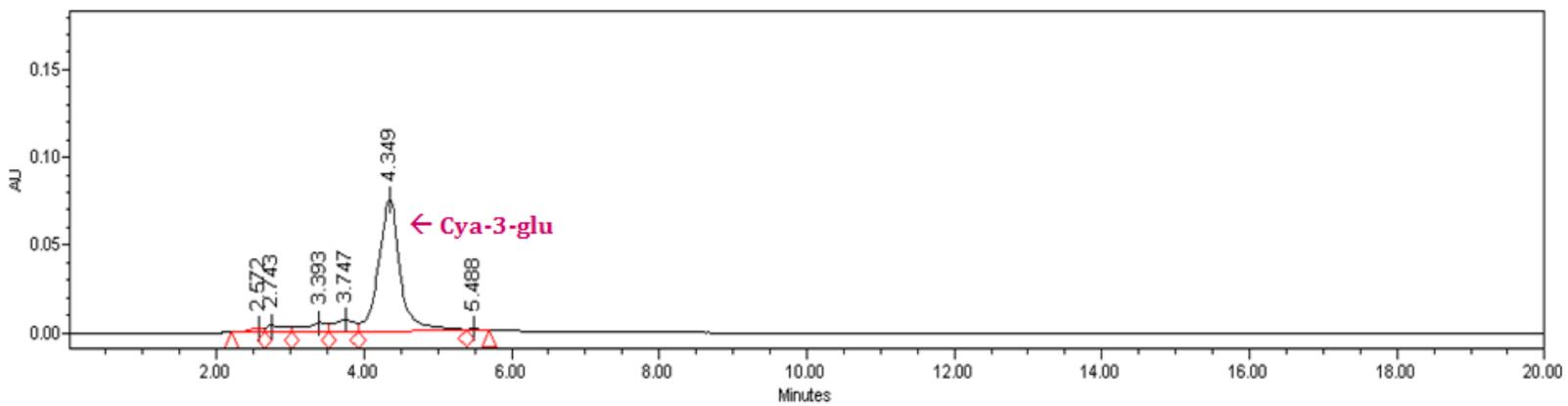
ANEXO D. Espectro ESI-MS de ricinoleato de propilo (PRO)



Peak True - sample "OT7773-PRO1:3", peak 8, at 534.413 s



Estándar de cianidina-3-glucósido 0.05 g/mL



Nombre	Tiempo de retención (min)	Área	% área	Altura
1	2.572	29559	1.58	2210
2	2.743	66406	3.56	3730
3	3.393	107667	5.77	5252
4	3.747	128461	6.89	6619
5	4.394	1523762	81.67	75030
6	5.488	9883	0.53	1137

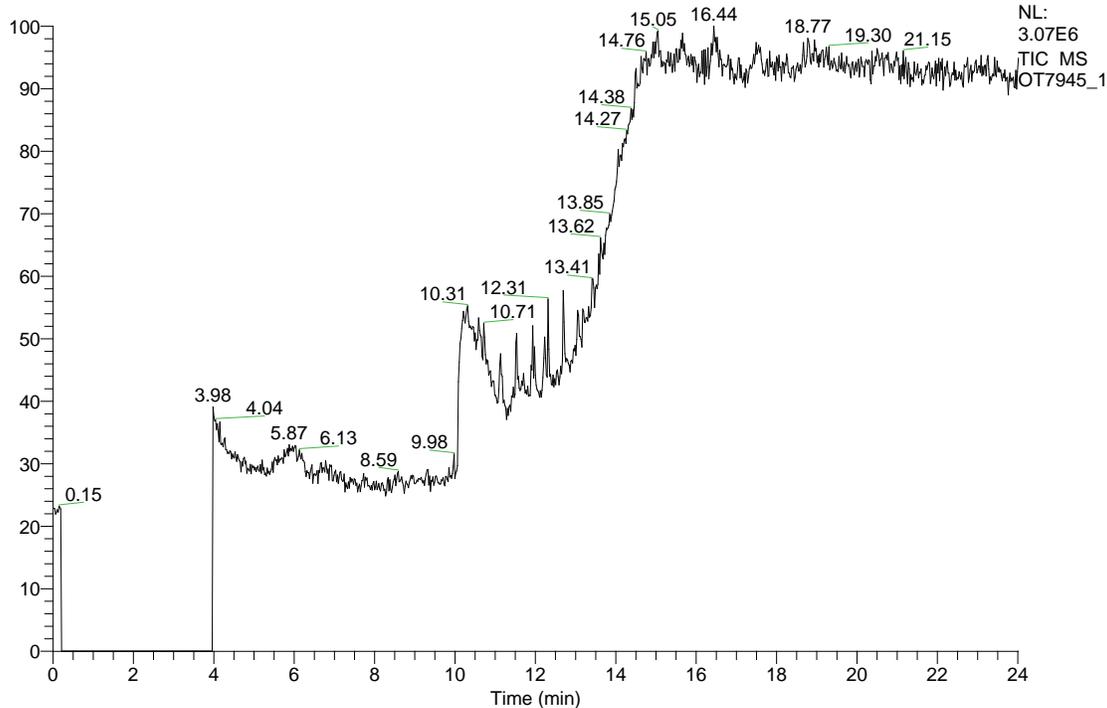
ANEXO F. Espectro ESI-MS de cumarato de metilo (MCUM)

D:\Xcalibur\data\USA\CG\OT7945_1

5/9/2012 2:11:05 PM

MCUM

RT: 0.00 - 24.01



OT7945_1 #488 RT: 10.27 AV: 1 SB: 267 16.23-21.83 NL: 1.28E5
T: + c EI Full ms [44.50-600.50]

