



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PRODUCCIÓN REGIOSELECTIVA DE 7-O-
LAUROILO DE ÁCIDO KÓJICO POR
CARBOXILESTERASAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

RICARDO ESQUIVEL BAUTISTA



MÉXICO D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: BLAS LOTINA HENNSEN

VOCAL: RAÚL GENARO AGUILAR CABALLERO

SECRETARIA: AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

1° SUPLENTE: JOSÉ ALFREDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ

2° SUPLENTE: OCTAVIO FUENTES RAMÍREZ

ESTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN LOS LABORATORIOS 312 Y 321 DEL CONJUNTO "E" DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM.

ASESOR

DRA. AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

SUPERVISOR TÉCNICO

DRA. CAROLINA PEÑA MONTES

SUSTENTANTE

RICARDO ESQUIVEL BAUTISTA

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segunda casa, mi casa de estudios.

A la Dra. Amelia Farrés por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, por confiar en mí y por todo el apoyo que me brindó, estoy sempiternamente agradecido.

A la Dra. Carolina Peña porque su optimismo siempre fue un antídoto contra mi abulia.

Al Dr. Arturo Navarro porque su punto de vista contribuyó a la riqueza científica de esta tesis.

A la M en C Sandra Pérez porque con ella aprendí que si algo sale bien puede salir mejor.

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

A mi familia por sus porras, en especial a mi papá Tachún.

A mis amigos Adrián, Juan Carlos, José Carlos y Sarahí por su apoyo y consejos.

A Pilar, Denise, Israel e Hilda, excelentes personas a quienes acudí cuando me surgieron dudas.

A todos mis compañeros del laboratorio 312 por su buena onda.

ÍNDICE GENERAL:

1. Resumen	1
2. Antecedentes:	4
2.1 Introducción	5
2.2 Ácido kójico	6
2.3 Biocatálisis:	8
2.3.1 Las enzimas y sus ventajas sobre catalizadores químicos	8
2.3.2 Clasificación de las enzimas	9
2.3.3 Hidrolasas:	10
Carboxilesterasas:	10
Esterasas	12
Lipasas	12
Cutinasas	13
2.3.4 Inmovilización de enzimas:	15
Inmovilización por adsorción	16
2.3.5 Biocatálisis en solventes orgánicos	17
2.3.6 Microorganismos como fuentes de biocatalizadores:	19
<i>Aspergillus nidulans</i>	20
<i>Bacillus pumilus</i>	21
3. Hipótesis	22
4. Objetivos:	24
4.1 General	25
4.2 Particulares	25
5. Desarrollo experimental:	26
5.1 Reactivos	27
5.2 Estrategia general	29
5.3 Biocatalizadores:	30
5.3.1 Cutinasa ANID_07541 de <i>Aspergillus nidulans</i> PW1:	30
Microorganismo y conservación:	30
Medio mínimo	30
Reactivación de la cepa	31
Cosecha de esporas	31
Producción de la enzima:	31
Medio optimizado	31
Concentración del extracto crudo por ultrafiltración	32
Inmovilización:	33
Pretratamiento del soporte	33
Adsorción de la enzima al soporte	33
Estabilidad de CutAn en almacenamiento a 4 °C	33
5.3.2 Esterasa StcI de <i>Aspergillus nidulans</i> PW1	34
5.3.3 Carboxilesterasas de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1	34
5.3.4 Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	34
5.3.5 Esterasas y hemicelulasas de <i>Aspergillus</i> sp.	34
5.3.6 Estabilidad operacional de los biocatalizadores por efecto del solvente orgánico	34
5.3.7 Determinación de actividad enzimática y concentración de proteína:	35
Cuantificación de la actividad enzimática	35
Cuantificación de proteína	35

5.4 Biocatálisis:	37
5.4.1 Vía quimio-enzimática:	37
Síntesis química de dilaurato de ácido kójico:	37
Esterificación de Steglich	37
Esterificación de alcoholes por cloruros de ácido	37
Purificación del dilaurato de ácido kójico	38
Reacción estándar de hidrólisis enzimática	38
5.4.2 Esterificación:	39
Reacción estándar de esterificación enzimática	39
5.4.3 Cromatografía en capa fina de las reacciones de biocatálisis	39
5.4.4 Rendimiento de las biocatálisis por HPLC:	40
Curvas de calibración	40
Acondicionamiento y análisis de las muestras	41
5.4.5 Purificación de 7-O-lauroilo de ácido kójico	41
6. Resultados y discusión:	43
6.1 Biocatalizadores:	44
6.1.1 Cutinasa ANID_07541 de <i>Aspergillus nidulans</i> PW1:	44
Rendimiento de inmovilización y pérdida de	
funcionalidad de CutAn	45
Estabilidad del biocatalizador CutAn en	
almacenamiento a 4 °C	48
6.1.2 Estabilidad operacional de los biocatalizadores por	
efecto del solvente orgánico	48
6.1.3 Actividad enzimática de los biocatalizadores	50
6.2 Biocatálisis:	51
6.2.1 Vía quimio-enzimática:	51
Síntesis química de dilaurato de ácido kójico:	51
Esterificación de Steglich	51
Esterificación de alcoholes por cloruros de ácido	53
Comparación de los métodos para la síntesis	
química de dilaurato de ácido kójico	54
Reacción estándar de hidrólisis enzimática	55
6.2.2 Esterificación:	56
Reacción estándar de esterificación enzimática	56
6.2.3 Rendimiento de las biocatálisis	58
7. Conclusiones	61
8. Bibliografía	63
9. Apéndice:	67
9.1 Curvas de calibración:	68
9.1.1 Curva de calibración de <i>p</i> -nitrofenol para la cuantificación	
de actividad enzimática por el método Nawani <i>et al</i> (2006)	68
9.1.2 Curva de calibración de Bradford para cuantificación	
de proteína	69
9.1.3 Curva de calibración HPLC para la cuantificación de	
7-O-lauroilo de ácido kójico	70
9.1.4 Curva de calibración HPLC para la cuantificación de	
ácido kójico	71
9.2 Espectro de RMN ¹ H del 7-O-lauroilo de ácido kójico	72

ABREVIATURAS:

AK	Ácido kójico
AL	Ácido laúrico
BSA	Seroalbúmina bovina
CarBp	Carboxilesterasas de <i>Bacillus pumilus</i> inmovilizadas en Accurel MP 1000
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CL	Cloruro de lauroilo
CLEA	Cross link enzyme aggregates
CLEC	Cross link enzyme crystals
CutAn	Cutinasa ANID_07541 de <i>A. nidulans</i> PW1 inmovilizada en Accurel MP 1000
DAK	Dilaurato de ácido kójico
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCU	Diciclohexilurea
DMAP	4-N-N-dimetilaminopiridina
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EC	Enzyme Commission
EshAs	Cóctel enzimático comercial de esterasas y hemicelulasas de <i>Aspergillus</i> sp. Sternzym® EFX Mega
EstAn	Esterasa StcI de <i>A. nidulans</i> PW1 inmovilizada en Accurel MP 1000
eq	Equivalente mol
GRAS	Generally Recognized As Safe
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
h	Hora
Hz	Hertz
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LipCa	Biocatalizador comercial lipasa B de <i>Candida antarctica</i> Novozym® 435
TMAK	7-O-lauroilo de ácido kójico

MHz	Mega hertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -nitrofenol
<i>p</i> -NPL	<i>p</i> -nitrofenil laurato
ppm	Partes por millón
R _f	Ratio of front
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
UV	Ultra violeta
δ	Desplazamiento químico (ppm)
μ	Micra

1. Resumen

RESUMEN

El ácido kójico (5-hidroxi-2-(hidroximetil)-1,4-pirona) tiene varias aplicaciones en la industria por sus propiedades bioactivas. De las esterificaciones posibles que puede sufrir, sólo el derivado esterificado en la posición C-7 conserva las propiedades bioactivas y, además, es más liposoluble, facilitando su aplicación en matrices oleosas.

Cada vez es mayor el número de compuestos químicos que son producidos por biocatálisis empleando enzimas microbianas inmovilizadas debido a la selectividad y especificidad en las reacciones que catalizan. Las carboxilesterasas son un grupo de enzimas que generalmente son apropiadas para síntesis orgánica ya que utilizan un amplio rango de sustratos, son estables y activas en solventes orgánicos, no requieren cofactores y se pueden obtener fácilmente de varios microorganismos.

En este trabajo se llevó a cabo la inmovilización de la cutinasa ANID_07541 de *Aspergillus nidulans* PW1 en Accurel MP 1000, a la cual, se le determinó la estabilidad en almacenamiento a 4 °C y se le empleó en las pruebas de biocatálisis que se mencionan más adelante.

Se realizaron pruebas de estabilidad operacional de los biocatalizadores en diferentes solventes orgánicos. Se observó que la lipasa de *Candida antarctica* y la cutinasa de *A. nidulans* mostraron mayor estabilidad cuando se empleó tolueno como medio de reacción. Los otros tres biocatalizadores empleados: la lipasa de *Bacillus pumilus* y las estererasas de *A. nidulans* y de *Aspergillus* sp, presentaron mejor estabilidad en hexano.

Para llevar a cabo la producción regioselectiva de 7-O-lauroilo de ácido kójico mediante biocatálisis, se ensayó con las cinco carboxilesterasas antes mencionadas y se propusieron dos metodologías: la vía quimio-enzimática y la esterificación enzimática. Para llevar a cabo la primera, se produjo inicialmente por síntesis química el dilaurato de ácido kójico por dos métodos: la esterificación de Steglich y la esterificación de alcoholes por cloruros de ácido. Se observó un mayor rendimiento y un menor tiempo de reacción para la esterificación de

RESUMEN

alcoholes por cloruros de ácido. El rendimiento y el tiempo de reacción se vieron influenciados por el impedimento estérico del ácido kójico y la reactividad de los compuestos.

Posteriormente el dilaurato de ácido kójico se empleó como sustrato para la hidrólisis enzimática, que fue regioselectiva sobre la posición C-5. En la esterificación enzimática los sustratos fueron tanto el ácido kójico como el ácido laúrico y la síntesis fue regioselectiva en la posición C-7. En esta reacción se controló la cantidad de agua en el sistema de reacción. La cutinasa de *A. nidulans* fue adecuada para ambas metodologías, mientras que la lipasa de *C. antarctica* y la esterasa de *Aspergillus* sp fueron adecuadas para la esterificación. El mayor rendimiento en la producción de 7-O-lauroilo de ácido kójico fue con la lipasa de *C. antarctica* (72.8 %). Los resultados dependieron del solvente orgánico que se empleó como medio de reacción.

2. Antecedentes

2.1 Introducción

Es ampliamente reconocido el gran potencial de la biocatálisis en varias aplicaciones industriales. Durante cientos de años, varias transformaciones enzimáticas han sido usadas en la elaboración de vino y pan, la coagulación de la leche y la fabricación de cerveza. A esta lista hay que agregar procesos exitosos en tecnología de alimentos, como la producción de jarabe de maíz de alta fructosa, hidrólisis de la lactosa y la sacarificación de materiales crudos que contienen almidón. La industria de alimentos es una gran consumidora de enzimas. Sin embargo, el uso de las enzimas como catalizadores prácticos en la industria química ha sido limitado. Esto es principalmente atribuido a su elevado costo, relativa inestabilidad en severas condiciones industriales y la fuerte competencia que hay por parte de los comunes y bien establecidos procesos químicos. Sin embargo, la enzimología aplicada siempre ha sido un área con altas expectativas. Las propiedades únicas de las enzimas, como su superior regio y estereoselectividad, capacidad para catalizar una gran variedad de reacciones bajo condiciones suaves, no toxicidad y biodegradabilidad hacen de éstas potencialmente útiles en varias aplicaciones.

El ácido kójico es usado en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética por sus propiedades antioxidante, quelante e inhibitoria de polifenol oxidasas. Dado que es hidrosoluble, se ha tratado de incrementar su lipofilia mediante la esterificación, sin embargo, sólo la esterificación en la posición C-7 produce un derivado que conserva las propiedades del ácido kójico, ya que el grupo hidroxilo en C-5 es el que le confiere las propiedades bioactivas antes mencionadas.

En este trabajo se llevó a cabo la producción regioselectiva de 7-O-lauroilo de ácido kójico mediante biocatálisis. Para conseguirlo se ensayó con cinco carboxilesterasas y se exploraron dos metodologías: 1) la vía quimio-enzimática, en la cual, en primera instancia, se realizó la producción química de dilaurato de ácido kójico que, después, fue el sustrato para la hidrólisis enzimática, y 2) la esterificación enzimática directa del ácido kójico con ácido láurico.

2.2 Ácido kójico

El ácido kójico (AK), 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-1,4-pirona, que se muestra en la Figura 2.1, es un metabolito producido principalmente por especies del género *Aspergillus*, un grupo de hongos utilizados en la producción de distintos alimentos fermentados tradicionales como sake, miso (pasta de soya), shoyu (salsa de soya), amazake (bebida dulce), shouchu (bebida alcohólica destilada) y mirin (sazonador alcohólico dulce) que se consumen sobre todo en Japón.

Es un aditivo de alimentos que se utiliza como antioxidante en sustitución del galato de metilo o del galato de n-propilo cuando el uso de éstos no se recomienda en alimentos procesados, en la que se usa como conservador para prevenir la formación del sabor a recalentado en la carne de res, como coadyuvante para inhibir la formación de nitrosopirrolidina en tocino frito y para enrojecer fresas no maduras. También se utiliza como materia prima para la síntesis de los potenciadores de sabor maltol y etil maltol. Favorece la formación de productos de color amarillo cuando las o-quinonas están presentes. Por su efecto inhibitorio contra las polifenol oxidasas, el AK se usa para inhibir el pardeamiento enzimático (Burdock *et al*, 2001)

Durante alrededor de 400 años, el tradicional sake en Japón se ha producido mezclando manualmente arroz cocido y *Aspergillus* sp., y como consecuencia las manos de los trabajadores se vuelven blancas. Esto ocurre porque el AK inhibe la tirosinasa, con lo cual, se detiene la producción de melanina y así favorece el blanqueamiento de la piel. Por esta razón se emplea en formulaciones cosméticas. (Raku & Tokiwa, 2003; Noh *et al*, 2009)

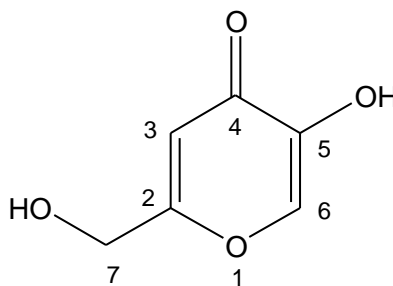


Figura 2.1. Estructura del ácido kójico.

ANTECEDENTES

El AK actúa como un buen quelante de iones metálicos de transición, tales como Cu^{2+} y Fe^{3+} , y es secuestrador de radicales libres. El grupo hidroxilo en la posición C-5 es esencial para secuestrar radicales y presentar actividad anti-tirosinasa.

Aunque el AK es útil, su inestabilidad contra el calor y la luz, su baja solubilidad en matrices oleosas y un sabor amargo, restringen su uso en productos alimenticios. Por otra parte, su uso en cosmética se ha limitado, ya que causa irritación de la piel por citotoxicidad. Para superar estas limitaciones y mejorar sus propiedades, se han sintetizado muchos derivados del AK, mediante la conversión del grupo hidroxilo de la posición C-7 en éster, hidroxifenil éter, glucósido, derivados de aminoácidos o de tripéptidos (Hsieh *et al*, 2006, Noh *et al*, 2009)

Para sintetizar un éster de AK, la esterificación química puede ser más económica, sin embargo, los resultados son usualmente una mezcla compleja, generando un producto que no es fácil purificar. En contraparte, la reacción enzimática puede producir regioselectivamente ésteres de AK en la posición C-7, cuya calidad es alta (Chen *et al*, 2002).

2.3 Biocatálisis

2.3.1 Las enzimas y sus ventajas sobre catalizadores químicos

La naturaleza es extremadamente diversa en términos del gran número y tipos de moléculas orgánicas que requiere para la vida. Esta diversidad es posible gracias a la capacidad catalítica de las enzimas, que puede ser aprovechada y usada para la síntesis de productos de importancia comercial, lo que representa la base tecnológica de las aplicaciones de la biocatálisis.

Las enzimas se diferencian de los catalizadores químicos ordinarios en varios aspectos importantes:

1. Velocidades de reacción más elevadas: los altos números de conversión encontrados en muchas reacciones catalizadas enzimáticamente son frecuentemente mayores a las reacciones que emplean catalizadores químicos convencionales, debido a que las velocidades de las reacciones catalizadas por las enzimas son superiores, en factores típicamente de 10^6 a 10^{12} , a las reacciones correspondientes sin catalizar y son, al menos, varios órdenes de magnitud mayores que las de las reacciones equivalentes catalizadas químicamente.

2. Condiciones de reacción más suaves: las reacciones catalizadas enzimáticamente transcurren, generalmente, a temperaturas por debajo de 100 °C, a presión atmosférica y a valores de pH casi neutros. Por el contrario, la catálisis química eficaz requiere con frecuencia de temperaturas y presiones elevadas, así como de valores de pH extremos.

3. Especificidad y selectividad mayor: las enzimas exhiben un grado de especificidad muy grande, tanto respecto a las identidades de sus sustratos como de sus productos, mayor que los catalizadores químicos; la catálisis enzimática es inherentemente más selectiva que la síntesis química convencional. Esta selectividad es frecuentemente posicional (por ejemplo, regioselectividad) o quiral (por ejemplo, estereoselectividad). Mientras que se han llevado a cabo una gran

ANTECEDENTES

cantidad de trabajos para hacer altamente selectivos a los catalizadores químicos, las enzimas han evolucionado a lo largo de billones de años para tener su alto grado de perfección. La alta especificidad y selectividad tienen algunos beneficios clave, que incluyen, la reducción de sitios de reacción, fácil separación y pocos efectos potencialmente negativos al medio ambiente, es decir, las reacciones enzimáticas raramente proporcionan productos laterales.

4. Capacidad para la regulación: las actividades catalíticas de muchas enzimas varían en respuesta a las concentraciones de sustancias diferentes de sus sustratos.

Adicionalmente, otro factor que hace de las enzimas potencialmente útiles para aplicaciones comerciales, es la amplia variedad de reacciones que son capaces de catalizar (Voet, 2009).

2.3.2 Clasificación de las enzimas

Más de 30 000 enzimas han sido caracterizadas en algún grado. Las enzimas se clasifican y designan de acuerdo con la naturaleza de las reacciones químicas que catalizan *in vivo*. Existen seis clases principales de reacciones que catalizan las enzimas, así como subclases y sub-subclases (Tabla 2.1). A cada enzima se le asignan dos nombres y una clasificación de cuatro números. Su nombre recomendado, resulta conveniente para el empleo diario y es, con frecuencia, el nombre trivial de la enzima. Su nombre sistemático se emplea cuando la ambigüedad debe hacerse mínima: consiste en el nombre del (de los) sustrato(s) seguido de la palabra que acabe en *asa* y que especifica el tipo de reacción que cataliza la enzima, de acuerdo con la clasificación del grupo principal. El número de clasificación de las enzimas va precedido de las letras EC que significan Comisión de Enzimas (Enzyme Commission). Estas reglas fueron establecidas por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB).

ANTECEDENTES

Tabla 2.1. Clasificación de enzimas

Clasificación	Tipo de reacción catalizada	Subclases representativas
(1) Oxidorreductasas	Reacciones de óxido-reducción	Oxidasas, oxigenasas, peroxidasas, deshidrogenasas
(2) Transferasas	Transferencia de grupos funcionales	Glicosiltransferasas, metiltransferasas, transaldolasas, transcetolasas, aciltransferasas, alquiltransferasas, transaminasas, sulfotransferasas, fosfotransferasas, nucleotidiltransferasas
(3) Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis	Esterasas, lipasas, glicosidasas, proteasas, sulfatasas, fosfatasas, aminoacilasas, endo y exo-nucleasas, halohidrolasas
(4) Liasas	Eliminación de grupo para formar enlaces dobles	Descarboxilasas, aldolasas, cetolasas, hidratasas, deshidratasas, polisacárido liasas, amoniaco liasas
(5) Isomerasas	Isomerización	Racemasas, epimerasas, isomerasas
(6) Ligasas	Formación de enlace acoplada con la hidrólisis de ATP	Sintetasas, carboxilasas

2.3.3 Hidrolasas

La hidrólisis consiste en la adición de una molécula de agua que conlleva la ruptura o descomposición de un compuesto en otras especies moleculares distintas. Un éster, por ejemplo, con una molécula de agua es hidrolizado hasta un ácido y un alcohol (Figura 2.2). Son reacciones que están catalizadas por enzimas que reciben el nombre genérico de hidrolasas. Las hidrolasas son un grupo amplio de enzimas que catalizan la ruptura de muchos tipos de enlaces: carboxilesterasas, peptidasas, fosfatasas, lipasas, nucleasas, sulfatasas, etc.

Carboxilesterasas

También conocidas como carboxilesterhidrolasas (EC 3.1.1.X) son un grupo de enzimas que hidrolizan ésteres carboxílicos, tienen elevada actividad hidrolítica sobre muchos tipos de ésteres.

ANTECEDENTES

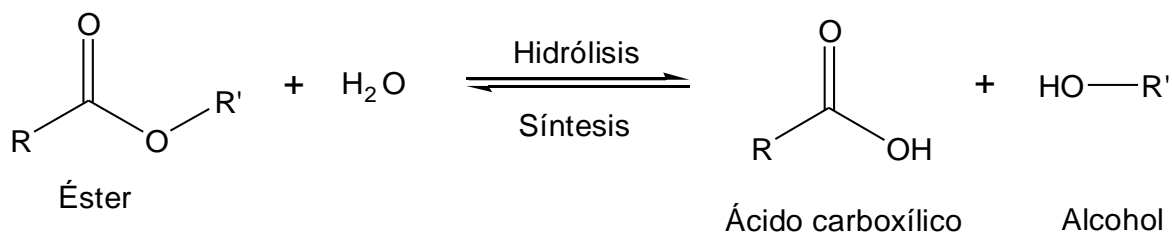
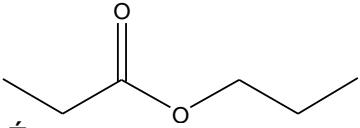
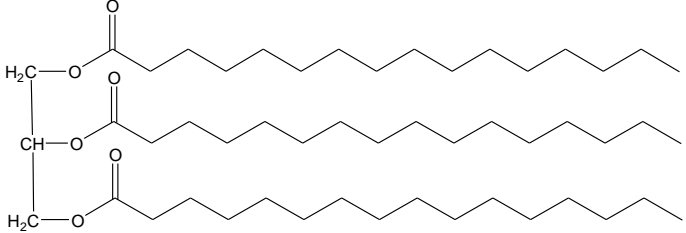
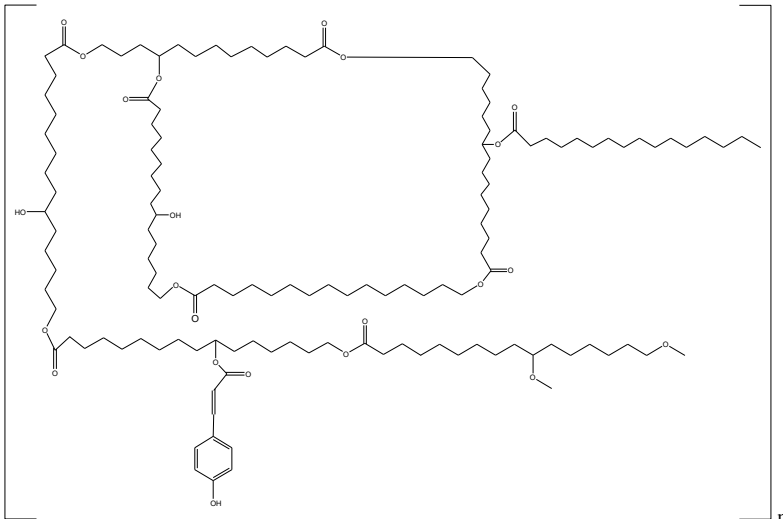


Figura 2.2. Reacción de hidrólisis del enlace éster.

Dentro de este grupo se ubica a las esterasas, lipasas y cutinasas, que se diferencian entre sí por el tipo de sustratos que aceptan (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Sustratos naturales de algunas carboxilesterasas

Carboxilesterasa	Sustrato natural
Esterasa	 <p>Ésteres de cadena corta</p>
Lipasa	 <p>Triacilglicéridos de cadena larga</p>
Cutinasa	 <p>Cutina</p>

ANTECEDENTES

Esterasas

Las esterasas (EC 3.1.1.1) hidrolizan ésteres pequeños que son parcialmente solubles en agua, con la liberación de un ácido carboxílico y un alcohol.

Al igual que las lipasas y las cutinasas, las esterasas forman parte de la familia de las serin hidrolasas, que presentan la clásica triada catalítica formada por Ser-His-Asp/Glu. A diferencia de las lipasas, las esterasas no presentan activación interfacial ni presentan una “tapa” que cubra el sitio activo (Fojan *et al.*, 2000).

Las esterasas suelen presentar alta quimioselectividad y enantioselectividad en las reacciones que catalizan. Se han utilizado en las industrias de alimentos, papel, textil y detergentes, así como en el tratamiento de residuos, productos de química fina y la síntesis de fármacos (Volcan *et al.*, 2008).

Bornscheuer & Kazlauska (2006) emplearon esterasas de origen microbiano en la resolución de alcoholes primarios y secundarios y ácidos carboxílicos. Peña-Montes (2009) usó la esterasa StcI de *A. nidulans* en la desacetilación regioselectiva del AK y de varios flavonoides.

Lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3) cuyos sustratos naturales son los triacilglicéridos de cadena larga, se pueden clasificar en tres grupos en función de su especificidad. Las lipasas inespecíficas hidrolizan aleatoriamente los triacilglicéridos, produciendo ácidos grasos libres y glicerol, con monoacilglicéridos y diacilglicéridos como intermediarios. Las lipasas (1,3-específicas) catalizan la liberación de ácidos grasos en las posiciones 1 y 3 de la cadena del glicerol. Con lipasas específicas a ácidos grasos, sólo un determinado tipo de ácidos grasos es liberado de los acilglicéridos (Yahya *et al.*, 1998).

El sitio catalítico de las lipasas, a menudo, está confinado en un túnel hidrofóbico cubierto por una estructura α -helicoidal que actúa como una tapa que puede prevenir la actividad proteolítica sobre la tríada catalítica, confiriendo protección a la enzima. La cara de la tapa que mira hacia el sitio catalítico está compuesta

ANTECEDENTES

principalmente de hidrocarburos alifáticos, mientras que la cara opuesta es hidrofílica, por lo que el sitio activo permanece inaccesible cuando se encuentran en medio acuoso. La apertura de la tapa tiene lugar cuando la lipasa interacciona con la interfase aceite/agua. Este fenómeno se conoce como activación interfacial y está asociado con la reorientación de la de tapa α -helicoidal, el aumento de la hidrofobicidad en las inmediaciones de la superficie del sitio activo y la exposición del sitio activo.

Las fuentes más comunes de lipasa son los microorganismos, seguidos por las células de mamíferos y plantas. Los pesos moleculares de estas enzimas se encuentran dentro de un rango de 20 a 60 kDa (Yahya *et al*, 1998).

La principal aplicación de lipasas en química orgánica es la resolución de compuestos enantioméricos, en virtud de la enantioselectividad que muestran estas enzimas. En ausencia de agua o en cantidades traza catalizan reacciones de esterificación, transesterificación e interesterificación. Dada su capacidad catalítica, tienen diversas aplicaciones, como la modificación de grasas y aceites, síntesis de nuevos tensoactivos y productos farmacéuticos, en procedimientos analíticos y en la resolución de mezclas racémicas. La mayoría de las lipasas GRAS (Generally Recognized As Safe) se han empleado con éxito en la industria de lácteos, principalmente para la aceleración de la maduración en los quesos de tipo italiano, así como para la hidrólisis acelerada de la grasa de la leche para ser finalmente utilizada como aditivo en la fabricación de productos para mejorar el sabor (por ejemplo, aderezos, sopas y salsas) (Paiva *et al*, 2000; Pastorino *et al*, 2004; Sivozhelezov *et al*, 2009; Ceni *et al*, 2011).

Cutinasas

Las cutinasas (E.C. 3.1.1.74) son enzimas extracelulares, secretadas por hongos fitopatógenos, que son responsables de la hidrólisis *in vivo* de la cutina, un poliéster compuesto por ácidos grasos, generalmente n -C₁₆ y n -C₁₈ que contienen de uno a tres grupos hidroxilo, éste biopolímero cubre y protege a las plantas contra los microorganismos patógenos. Al final, estas enzimas son capaces de

ANTECEDENTES

eliminar todo tipo de monómeros del biopolímero. Las cutinasas muestran actividad hidrolítica hacia una amplia variedad de ésteres alifáticos, en primer lugar se les puede considerar como esterasas que hidrolizan la cutina, pero también pueden funcionar y ser clasificadas como lipasas (Fontes & Alves, 2007).

De acuerdo a lo reportado por Borreguero *et al.* (2001), la triada catalítica de las cutinasas no está protegido por una tapa, no presentan activación interfacial y la cavidad oxianiónica se encuentra preformada, éstas son características particulares de las cutinasas.

Las cutinasas son enzimas versátiles que muestran varias propiedades interesantes para su aplicación en procesos industriales. Un preparado enzimático que contiene cutinasas ha sido desarrollado para aumentar el efecto farmacológico de los productos agroquímicos y también ha sido aplicada como una enzima lipolítica para la eliminación de grasa en la ropa y en detergentes para lavar platos. La degradación de plásticos, tales como el poliéster de policaprolactona sintético, en productos solubles en agua, se ha logrado gracias al empleo de cutinasas.

En los últimos años, se han publicado varios trabajos que ilustran la importancia de la transesterificación con cutinasas en diversas áreas como la industria farmacéutica, los alimentos, los productos químicos y la síntesis de péptidos, entre otras (Fontes & Alves, 2007).

Otros usos potenciales incluyen la hidrólisis de la grasa de la leche en la industria láctea, aplicaciones en la industria oleoquímica, en la síntesis de triacilglicéridos estructurados, de polímeros y de surfactantes para productos de cuidado personal, y en productos farmacéuticos y agroquímicos que contienen uno o más centros quirales. También se ha reportado su uso en la fabricación de telas de lana, en la degradación de insecticidas y de sustancias tóxicas, y en la producción de biodiesel (Wang *et al.*, 2009; Horii *et al.*, 2010).

2.3.4 Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confinan o localizan o restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas varias veces.

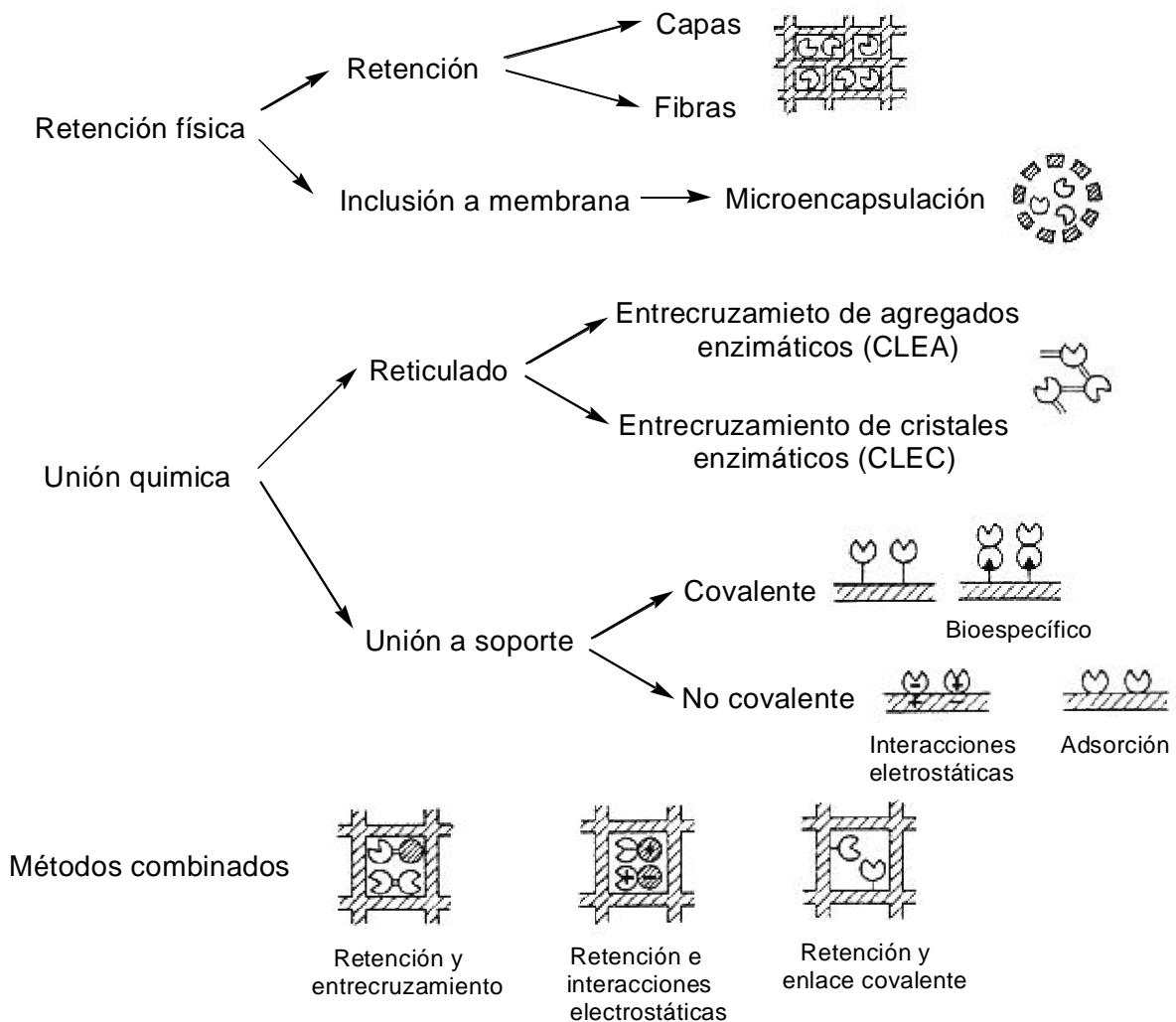


Figura 2.2. Clasificación de los métodos de inmovilización.

Son varios los métodos de inmovilización, pero estos, generalmente, se clasifican dentro de dos grandes grupos: la retención física y la unión química al soporte (Figura 2.2). En ocasiones se presentan problemas que no pueden ser

ANTECEDENTES

solucionados por un método individual y por esta razón se combinan métodos básicos dando origen a innovadoras formas de inmovilización (Arroyo, 1998).

Las lipasas, generalmente, se inmovilizan por unión covalente, retención (atrapamiento) y adsorción sobre soportes iónicos e hidrofóbicos. Dada la gran superficie hidrofóbica alrededor de los sitios activos, se cree que la inmovilización de las lipasas sobre soportes hidrofóbicos es conveniente, ya que, asegura (Volcan *et al*, 2008):

1. La hiperactivación de la mayoría de las lipasas,
2. Adsorción altamente selectiva, que en algunos casos produce la purificación,
3. Enantioselectividad mayor, y
4. El soporte se puede recuperar después de la desactivación de enzimas.

Inmovilización por adsorción

En la adsorción, la enzima se une a un soporte mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno. Los principales factores que influyen en la adsorción, son:

1. El pH del medio: controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la enzima y del soporte;
2. La fuerza iónica: al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la enzima;
3. El diámetro de poro: debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima;
4. La presencia de iones que actúen como cofactores de la enzima, ya que pueden incrementar la carga enzimática en el soporte.

Como principales ventajas de este método destacan:

ANTECEDENTES

1. Su preparación sencilla,
2. Su bajo costo,
3. No hay cambios de especificidad enzimática,
4. Las enzimas inmovilizadas son estables en medios de trabajo con bajo contenido en agua.

Los inconvenientes de la adsorción son principalmente (Arroyo, 1998):

1. La optimización de las variables que controlan la adsorción,
2. Las enzimas inmovilizadas obtenidas son poco estables desde el punto de vista mecánico,
3. La unión al soporte es débil.

La cantidad de enzima adsorbida sobre un soporte sólido depende, como es de esperar, de la cantidad de unidades de superficie del soporte, que están disponibles durante la inmovilización, y por lo tanto, la actividad del biocatalizador aumenta al incrementar la concentración de la enzima en el sobrenadante, hasta que el valor de saturación asintótico es finalmente alcanzado en altas concentraciones de enzima. Tanto tiempo y temperatura desempeñan importantes funciones en la cinética de la inmovilización por adsorción, en particular con los soportes porosos, debido a la resistencia de la difusión intraparticular, además de resistencia de la capa de Nernst (Paiva *et al*, 2000)

2.3.5 Biocatálisis en solventes orgánicos

Las enzimas industriales han sido usadas predominantemente en medios acuosos, sin embargo, debido a la baja solubilidad de muchos compuestos orgánicos en agua (grasas, aceites, ácidos grasos y alcoholes, compuestos aromáticos, esteroides, etc.), reacciones secundarias indeseadas (hidrólisis, migración de acilos, adición nucleofílica del ion hidróxido) y un desfavorable

ANTECEDENTES

equilibrio termodinámico, el agua es un medio de reacción pobre para la mayoría de las transformaciones químicas.

Existen numerosas aplicaciones de las lipasas en medios no acuosos. En 1966 se publicó el primer estudio de una reacción enzimática en medio orgánico, sin embargo, estos estudios han aumentado a partir de 1984 cuando Klivanov demostró que la actividad enzimática no está limitada a llevarse a cabo en medio acuoso (Koskinen & Klivaniv, 1998).

Los factores que influyen en la actividad y estabilidad de las enzimas en disolventes orgánicos son el estado iónico de la enzima, el contenido de agua en el sistema, la hidratación de la enzima y la transferencia de masa.

En medio orgánico, el agua ligada al biocatalizador bien puede ser la única en el sistema. Los solventes orgánicos pueden afectar la reacción al interactuar directamente con las enzimas o al extraer el agua de las enzimas, lo cual, modifica la conformación provocando su inactivación. A bajos a_w (valores menores a 1), la cantidad de agua unida a la enzima es independiente del tipo de solvente, sin embargo, raramente se maneja el parámetro a_w en experimentos debido a la dificultad en su determinación. Por otra parte, la hidrofobicidad de los solventes orgánicos está relacionada con el parámetro $\log P_{oct}$. Solventes con $\log P_{oct} \leq 2$ son hidrofílicos, capaces de secuestrar agua que se encuentra unida a la enzima y, por lo tanto, no son adecuados para biocatálisis. Solventes con valores $\log P_{oct}$ entre 2 y 4 son mucho menos hidrofílicos, pero no suelen ser muy idóneos. Solventes con altos valores de $\log P_{oct}$ son hidrofóbicos y, por lo tanto, son los mejores medios para llevar a cabo reacciones de biocatálisis (Yahya *et al*, 1998).

La utilización de solventes orgánicos en las reacciones enzimáticas proporciona ventajas puntuales que se enumeran a continuación (Serdakowski & Dordick, 2008):

1. El aumento de la solubilidad de los sustratos no polares.

ANTECEDENTES

2. El equilibrio termodinámico se desplaza para favorecer más la síntesis que la hidrólisis.
3. La supresión de reacciones secundarias que dependen del agua.
4. Cambios respecto a la especificidad y selectividad hacia los sustratos.
5. Fácil recuperación de la enzima.
6. Las enzimas pueden inmovilizarse por adsorción sobre superficies no porosas, ya que las enzimas, al ser insolubles en estos medios, difícilmente se desorben.
7. Por lo general, mayor termoestabilidad.
8. Eliminación de posible contaminación microbiana.
9. Facilidad para que las enzimas sean incorporadas a un proceso químico.

2.3.6 Microorganismos como fuentes de biocatalizadores

Las enzimas son aisladas de fermentaciones microbianas y de los tejidos celulares de animales y plantas. Las enzimas de bacterias, hongos y levaduras son las más empleadas en las biotransformaciones industriales. Con frecuencia las enzimas animales y vegetales están disponibles solo como polvos o suspensiones impuras y esto, por lo general, limita su uso. Además, dado que las enzimas animales y vegetales son aisladas de los subproductos industriales, su disponibilidad puede fluctuar ampliamente.

Las enzimas microbianas no sufren las limitaciones de enzimas animales y vegetales. Ya que, se pueden producir en grandes cantidades por fermentación y hay un vasto número de microorganismos que pueden ser utilizados para ese fin. La mayor parte de las enzimas comerciales son producidas por secreción extracelular. Por lo tanto, el proceso de obtención de las enzimas se simplifica con la remoción de células y sus restos, antes del aislamiento y la purificación.

Un gran problema en el aislamiento de enzimas, sin embargo, es que las células regulan estrictamente la síntesis de sus enzimas. Por consiguiente, la producción

ANTECEDENTES

óptima frecuentemente requiere la desrepresión o inducción de los sistemas de expresión génica de las células. Las células de bacterias son las más sensibles a la manipulación metabólica y, además, la mayor parte de las enzimas comerciales son producidas vía fermentación por lotes controlando la cantidad de fuente de carbono o de nitrógeno para provocar la inducción. El medio, por lo tanto, debe ser cuidadosamente preparado, y a menudo ocurre que para una elevada productividad se necesita de una elevada densidad celular.

Las fermentaciones no son caras y muchos materiales crudos (como almidones, suero de leche y cereales) son usados como fuentes de energía. Por otro lado, en la producción de enzimas de elevada pureza se suele requerir de complejos y costosos procedimientos de purificación; enzimas obtenidas de esta forma son empleadas en diagnósticos o en biotransformaciones de elevada selectividad.

Aspergillus nidulans

Los hongos filamentosos, en particular los del género *Aspergillus*, son los principales productores de actividades enzimáticas que tienen importantes aplicaciones en las industrias de alimentos y bebidas. *Aspergillus nidulans* es un hongo filamentososaprófito con distribución en todo el mundo, perteneciente a la familia de los ascomicetos. Es susceptible a la manipulación y análisis genéticos por lo que es usado como sistema modelo para la investigación. Aunque no se utiliza industrialmente es capaz de producir una gran variedad de actividades enzimáticas extracelulares (MacCabe *et al*, 2002).

A. nidulans PW1 es una cepa inocua que es auxótrofa a arginina. En trabajos previos del grupo de investigación, se han caracterizado e identificado 4 enzimas extracelulares: la esterasa StcI (35 kDa), la proteasa alcalina PrtA (37 kDa), la cutinasa ANID_07541 (29 kDa) y el producto de procesamiento post-traduccional de ANID_07541 (22 kDa) (Peña-Montes, 2009; Castro-Ochoa, 2011).

La esterasa StcI y la cutinasa ANID_07541, son de especial interés, ya que forman parte de los biocatalizadores, con los cuales, se llevó a cabo esta tesis (Tabla 2.3).

ANTECEDENTES

Bacillus pumilus

El género *Bacillus* pertenece a la familia Bacillaceae, son capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos gracias a sus enzimas hidrolíticas que son de interés biotecnológico, además, no se consideran patógenas para el ser humano.

Bacillus pumilus GMA1 fue aislado de aguas termales en Los Azufres, Michoacán, México (Bustos, 1995). A partir de este microorganismo extremófilo se ha inmovilizado un extracto enzimático que, a pesar de que muestra propiedades interesantes (como actividad carboxilesterasa a altas temperaturas y pH alcalino), en la actualidad se discute sobre la naturaleza del mismo (al parecer una lipasa).

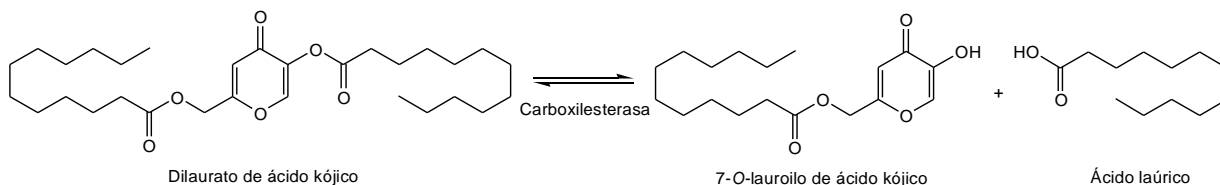
Tabla 2.3. Biocatalizadores producto de la investigación del grupo de trabajo que se emplearon en esta tesis.

Microorganismo fuente	Enzima	Peso (kDa)	Referencias		
			Identificación de la enzima	Inmovilización de la enzima	Evaluación en biocatálisis
<i>Aspergillus nidulans</i> PW1	Cutinasa ANID_07541	29	Castro-Ochoa, 2011	Vergara-Barroso, 2010	Vergara-Barroso, 2010
	Esterasa Stcl	35	Peña-Montes, 2009	Peña-Montes, 2009	Peña-Montes, 2009; Mondragón-Tintor, comunicación personal
<i>Bacillus pumilus</i> GMA1	Enzimas con actividad carboxilesterasa	20	Bustos, 1995	Zúñiga, 2004	Ruiz, 2007; Galindo & Álvarez, 2009; Bermúdez, 2010

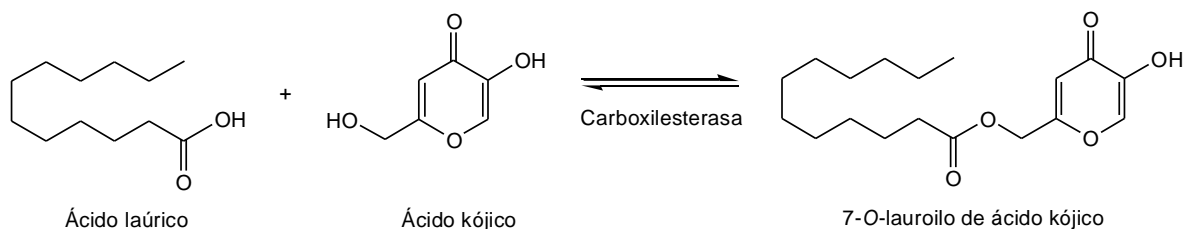
3. Hipótesis

HIPÓTESIS

- ✓ Si el (los) biocatalizador(es) es (son) regioselectivo(s) entonces efectuará(n) la hidrólisis del enlace éster en la posición C-5 del dilaurato del ácido kójico, mientras haya exceso de agua en el medio de reacción.



- ✓ En ausencia o cantidades traza de agua en el sistema y si el (los) biocatalizador(es) es (son) regioselectivo(s) entonces llevará(n) a cabo la síntesis del enlace éster en la posición C-7 del ácido kójico, empleando ácido láurico en la reacción.



- ✓ Considerando la longitud de la cadena alifática del ácido láurico (un ácido graso $n\text{-C}_{12}$) y la diferencia de especificidad por sustrato (respecto a la longitud de la cadena alifática) entre esterasas, lipasas y cutinasas, entonces la cutinasa es capaz de efectuar las biocatálisis planteadas en este trabajo.

4. Objetivos

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- ✓ Producir el 7-O-lauroilo de ácido kójico mediante biocatálisis regioselectiva, ya sea por hidrólisis o por esterificación (la reacción reversa), realizando ensayos con cinco carboxilesterasas diferentes como biocatalizadores.

4.2 Objetivos particulares

- ✓ Inmovilizar la cutinasa ANID_07541 de *A. nidulans* en Accurel MP 1000 y al biocatalizador resultante realizarle la prueba de estabilidad en almacenamiento a 4 °C para emplearlo en las pruebas de biocatálisis.
- ✓ Realizar pruebas de estabilidad operacional de los biocatalizadores en diferentes solventes orgánicos y determinar el solvente orgánico, en el cual, se efectuarán las biocatálisis.
- ✓ Llevar a cabo la vía quimio-enzimática que consiste en:
 1. Sintetizar el dilaurato de ácido kójico, buscando el método químico más adecuado para su producción.
 2. Emplear el dilaurato de ácido kójico como sustrato para la hidrólisis regioselectiva enzimática.
- ✓ Realizar la esterificación regioselectiva enzimática empleando ácido kójico y ácido laúrico como sustratos.
- ✓ Determinar el rendimiento de los ensayos en donde se observe la producción del 7-O-lauroilo de ácido kójico.

5. Desarrollo experimental

5.1 Reactivos

Tabla 5.1. Reactivos y marcas.

Reactivo	Marca
Aceite de oliva extra puro	Sigma-Aldrich
Acetato de etilo	Sigma-Aldrich
Acetonitrilo	Baker
Ácido acético glacial HPLC	Baker
Ácido clorhídrico	Baker
Ácido kójico	Técnica Química
Ácido laúrico	Baker
Agar bacteriológico	Oxoid
Albúmina sérica bovina	Sigma-Aldrich
Alcohol etílico	Tecsiquim
Arginina	Sigma-Aldrich
Azul de Coomassie concentrado	Bio-Rad
Biotina	Sigma-Aldrich
Carbonato de sodio	Baker
Cloruro de cobalto hexahidratado	Baker
Cloruro de manganeso	Baker
Cloruro de oxalilo	Sigma-Aldrich
Cloruro de potasio	Baker
Cloruro de sodio	Baker
EDTA tetrasódico	Baker
Extracto de levadura	Oxoid
Diciclohexilcarbodiimida	Baker
Diclorometano	Merck
2,2-Difenil-1-picrilhidrazil	Sigma
4-N-N-Dimetilaminopiridina	Sigma-Aldrich
Dextrosa	Baker
Fosfato de potasio dibásico	Mallinckrodt
Fosfato de potasio monobásico	Baker
Hexano	Baker

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Hidróxido de potasio	Baker
Hidróxido de sodio	Baker
Membrana de límite de extracción 10 000 Da	Milipore
Metanol HPLC	Sigma-Aldrich
Metionina	Research Organics
Molibdato de amonio hidratado	Baker
Nitrato de sodio	Reasol
<i>p</i> -nitrofenil laurato	Research Organics
<i>p</i> -nitrofenol 10µmol/ml (solución estándar)	Sigma-Aldrich
Peptona	Difco
Placas de aluminio de gel de sílice con un espesor de 0.2 mm Sil G/UV ₂₅₄	Macherey - Nagel
Placas de aluminio de gel de sílice con un espesor de 1.0 mm Sil G/UV ₂₅₄	Macherey - Nagel
Polipropileno microporoso en polvo MP 1000	Accurel
Sacarosa	Baker
Sulfato cúprico	Baker
Sulfato ferroso heptahidratado	Baker
Sulfato de magnesio	Merck
Sulfato de sodio anhidro	Sigma-Aldrich
Sulfato de zinc	Baker
Tolueno	Monterrey
Tween 80	Cosmopolita

5.2 Estrategia general

En la Figura 5.1 se presenta un esquema con el panorama general de la estrategia experimental que se llevó a cabo.

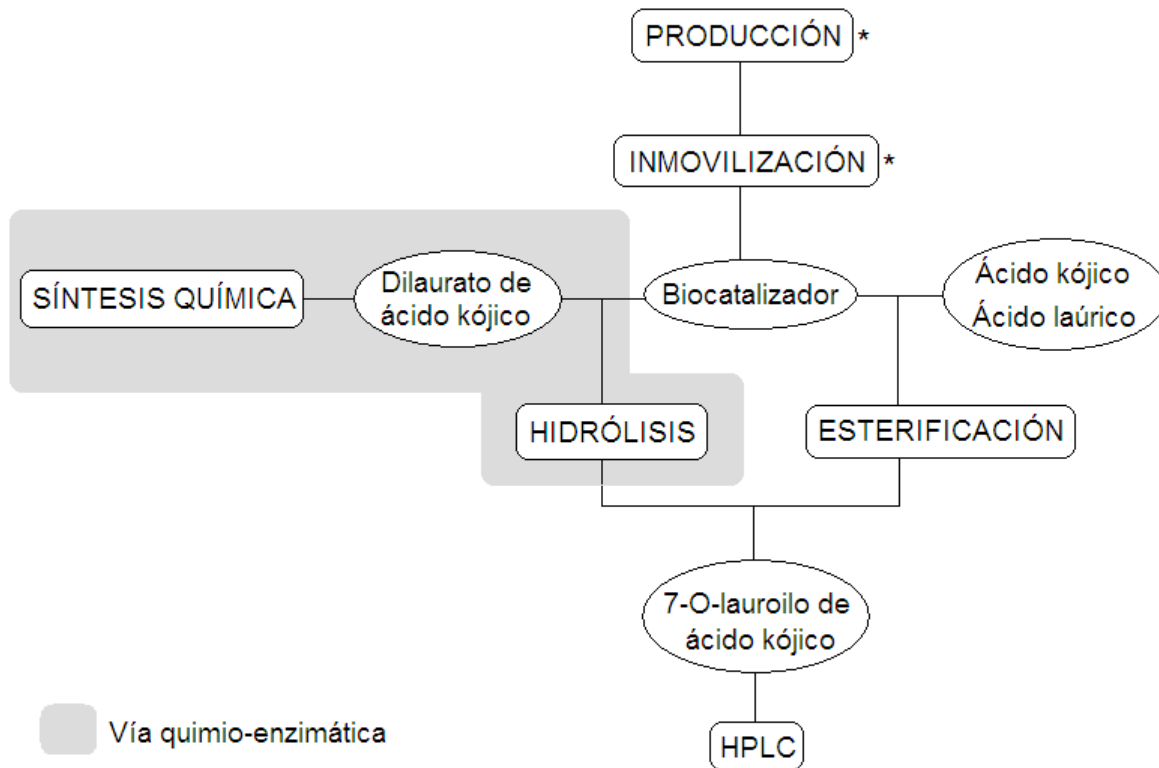


Figura 5.1. Esquema general de la experimentación.

*Esta parte de la metodología sólo se realizó para la cutinasa ANID_07541 de *A. nidulans* PW1.

A fin de seguir un orden lógico y comprensible, la metodología se presentará de la siguiente manera: primero se abordará lo relacionado a la producción de los biocatalizadores, después se señalará la vía quimio-enzimática, a continuación se mencionará la esterificación enzimática y se concluirá con el análisis High Performance Liquid Chromatography (HPLC) para calcular el rendimiento de las biocatálisis.

5.3 Biocatalizadores

5.3.1 Cutinasa ANID_07541 de *Aspergillus nidulans* PW1

Microorganismo y conservación

Se trabajó con el hongo *Aspergillus nidulans* PW1, cepa auxótrofa a arginina proporcionada por el Dr. Jesús Aguirre del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las esporas producidas por *A. nidulans* PW1 (que creció en medio mínimo) se mantuvieron conservadas en sílica gel a 4°C.

Medio mínimo

Se elaboró el medio de acuerdo a lo sugerido por Käfer *et al.* (1977) siguiendo las proporciones mostradas en la Tabla 5.2 (Käfer & Hill, 2001).

Tabla 5.2. Composición del medio mínimo para la reactivación de *A. nidulans* PW1.

Compuesto		Concentración
Sales	NaNO ₃	6 g/L
	KCl	0.52 g/L
	MgSO ₄ •7H ₂ O	0.52 g/L
	KH ₂ PO ₄	1.52 g/L
Elementos Traza	ZnSO ₄ •7H ₂ O	22 mg/L
	H ₃ BO ₃	11 mg/L
	MnCl ₂ •4H ₂ O	5 mg/L
	FeSO ₄ •7H ₂ O	5 mg/L
	CoCl ₂ •6H ₂ O	16 mg/L
	CuSO ₄ •5H ₂ O	16 mg/L
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	11 mg/L
	Na ₄ EDTA	50 mg/L
Requerimientos Nutricionales	Arginina	0.84 g/L
	Biotina	0.25 mg/L
	Metionina	11.18 mg/L
Glucosa		10 g/L
Agar		12.5 g/L

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Se prepararon soluciones “stock” de sales (20X), elementos traza (1000X), arginina (16.8%) y biotina (0.05%). Arginina y biotina se esterilizaron por filtración.

El pH del medio mínimo se ajustó a 6.5 y se esterilizó en la autoclave (SM300, Yamamoto) a 121 °C, 15 libras de presión durante 15 min.

Reactivación de la cepa

2 a 3 granos de sílica gel con esporas conservadas se sembraron en cajas petri con medio mínimo y se incubaron a 37 °C en un lapso de 3 a 5 días.

Cosecha de esporas

Para cosechar las esporas producidas por *A. nidulans* PW1 reactivado en medio mínimo se adicionaron 10 mL de Tween 80 al 0.1 % directamente sobre la caja petri. Posteriormente se rasparon las esporas con un asa micológica y se recuperaron en un tubo Falcon desechable de 50 mL. Se centrifugaron durante 10 min a 8500 rpm (Centrifuga Biofuge Primo R). El sobrenadante se desechó, se adicionaron 10 mL de agua destilada y se centrifugó bajo las condiciones antes descritas. Esta operación se repitió 2 veces más y finalmente las esporas se resuspendieron en 5 mL de agua destilada. Se realizó un conteo de esporas en el microscopio con un hematocitómetro. Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Producción de la enzima

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

Medio optimizado

El medio mínimo fue optimizado por Peña-Montes (2001) y Castro-Ochoa (2011) para inducir a *A. nidulans* PW1 a producir la cutinasa ANID_07541. La composición del medio optimizado se muestra en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Composición final del medio optimizado.

Compuesto		Concentración
Sales	NaNO ₃	6 g/L
	KCl	0.52 g/L
	MgSO ₄ •7H ₂ O	0.52 g/L
	KH ₂ PO ₄	1.52 g/L
Elementos Traza	ZnSO ₄ •7H ₂ O	22 mg/L
	H ₃ BO ₃	11 mg/L
	MnCl ₂ •4H ₂ O	5 mg/L
	FeSO ₄ •7H ₂ O	5 mg/L
	CoCl ₂ •6H ₂ O	16 mg/L
	CuSO ₄ •5H ₂ O	16 mg/L
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	11 mg/L
	Na ₄ EDTA	50 mg/L
Requerimientos nutricionales	Arginina	0.84 g/L
	Biotina	0.25 mg/L
	Metionina	11.18 mg/L
Extracto de levadura		5 g/L
Sacarosa		5 g/L
Inductor	Aceite de olivo	5 mL/L

Los compuestos del medio optimizado se adicionaron de acuerdo al orden presentado en la Tabla 5.3, para emulsificar el medio se usó un homogenizador (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel Ika® Labortechnik) a velocidad de 13,500 rpm durante 1 min. Se ajustó el pH a 6.5 y se esterilizó en la autoclave a 121°C, 15 libras de presión por un lapso de 15 min.

Concentración del extracto crudo por ultrafiltración

Después de fermentar, se retiró el micelio de *A. nidulans* PW1 del extracto crudo por filtración. Posteriormente el extracto crudo se ultrafiltró a 4°C en una celda con agitación (Amicon) usando una membrana YM con un límite de exclusión de 10 kDa.

Inmovilización

La inmovilización se realizó sobre el soporte hidrofóbico de polipropileno (Accurel MP 1000) siguiendo la metodología propuesta por Bosley & Peilow (1997) que fue modificada para la óptima adsorción de la cutinasa ANID_07541 de *A. nidulans* PW1 por Vergara-Barroso (2010).

Pretratamiento del soporte

El pretratamiento incrementa la afinidad de la superficie hidrofóbica del soporte por la enzima (Gitlesen, *et al.*, 1997; Foresti & Ferreira, 2004). El Accurel MP 1000 se sumergió en etanol absoluto, después se hizo lo mismo en una solución 50:50 de etanol/agua desionizada y finalmente se sumergió en agua desionizada; cada etapa de sumersión duró 30 min. Se filtró para eliminar el agua desionizada y el soporte se secó en estufa a 37°C por toda la noche.

Adsorción de la enzima al soporte

La concentración de proteína del extracto crudo concentrado se ajustó a 0.2 mg/mL con la adición de buffer de fosfatos pH 7.5, 50 mM.

El soporte pretratado se puso en contacto con el extracto crudo ajustado (1 g de Accurel MP 1000 por cada 50 mL de extracto) en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. Se incubó durante 3 h a 4 °C y 200 rpm en agitación orbital (Lab-Line 3518 Instruments Inc.). Al finalizar el tiempo de inmovilización, se lavó el biocatalizador con 100 mL de buffer de fosfatos (pH 7.5, 50 mM) y después con 100 mL de agua desionizada. Finalmente, la cutinasa ANID_07541 de *A. nidulans* PW1 inmovilizada en Accurel MP 1000 (CutAn) se secó en desecador por un intervalo de 24 h a 4 °C. Se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Estabilidad de CutAn en almacenamiento a 4 °C

El biocatalizador CutAn se almacenó durante 20 días a 4 °C y en ese periodo se midió la actividad enzimática (ver sección 5.3.7) en distintos tiempos y se

determinó la variación de la actividad respecto a la actividad inicial, es decir, se calculó la actividad residual (relativa).

5.3.2 Esterasa Stcl de *Aspergillus nidulans* PW1

Se produjo la esterasa Stcl de *A. nidulans* PW1 inmovilizada en Accurel MP 1000 (EstAn) de acuerdo a lo reportado por Peña-Montes *et al* (2009). Se guardó a 4 °C hasta su utilización.

5.3.3 Carboxilesterasas de *Bacillus pumilus* GMA1

Se elaboró el biocatalizador constituido por enzimas con actividad de carboxilesterasa de *Bacillus pumilus* inmovilizadas en Accurel MP 1000 (CarBp) según lo descrito por Zuñiga V. (2004). Se almacenó a 4 °C hasta su uso.

5.3.4 Lipasa B de *Candida antarctica*

Se adquirió el biocatalizador comercial lipasa B de *Candida antarctica* (LipCa) distribuida por Novozyme (Novo Nordisk A/S) bajo el nombre de Novozym[®] 435. Se guardó a 4 °C hasta su uso.

5.3.5 Esterasas y hemicelulasas de *Aspergillus* sp.

Se consiguió el coctel enzimático de esterazas y hemicelulasas de *Aspergillus* sp. (EshAs) no patógenos (estatus GRAS) comercialmente disponible cuyo nombre es Sternzym[®] EFX Mega (Mühlenchemie). Se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

5.3.6 Estabilidad operacional de los biocatalizadores por efecto del solvente orgánico

Para este ensayo se agregaron 10 mg de biocatalizador en 1 mL de solvente orgánico con a_w 0.33 (para establecer este a_w se siguió la metodología que propone Ruiz K., 2007) y 250 mg de tamiz molecular 4Å dentro de un vial ámbar de 8 mL con tapón de rosca, que durante 48 h, se mantuvo a 37 °C y 250 rpm en agitación orbital. Después el biocatalizador se separó del solvente y del tamiz, y posteriormente se secó en desecador a 4 °C durante 6 h. Este ensayo se realizó

para cada uno de los biocatalizadores y se llevó a cabo en tolueno, en acetonitrilo y en hexano. La actividad enzimática de los biocatalizadores se midió antes y después de realizar este ensayo, y se determinó la actividad residual (relativa).

5.3.7 Determinación de actividad enzimática y concentración de proteína

Cuantificación de la actividad enzimática

La actividad enzimática se cuantificó por el método espectrofotométrico descrito por Nawani *et al* (2006) utilizando como sustrato *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL). Para medir la actividad de la enzima en el extracto crudo se adicionaron 0.8 mL de buffer de fosfatos (pH 7.5, 50 mM), 0.1 mL de extracto crudo diluido 1:10 y 0.1 mL de *p*-NPL 0.01 M disuelto en etanol. Para determinar la actividad de los biocatalizadores se agregó 1 mg de biocatalizador en 0.9 mL de buffer de fosfatos (pH 7.5, 50 mM) y se adicionó 0.1 mL de *p*-NPL 0.01 M en etanol. En ambos casos la reacción se llevó a cabo durante 1 minuto a 37°C, después se agregaron 0.250 mL de Na₂CO₃ 0.1 M para detener la reacción por precipitación del sustrato que no reaccionó. La mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min y se midió la absorbancia a 420 nm. Un blanco sin enzima fue analizado en forma paralela. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto bajo condiciones de ensayo.

Se realizó una curva de calibración con el estándar *p*-nitrofenol en un intervalo de concentraciones de 0 a 0.05 μmol/mL para calcular la cantidad de *p*-nitrofenol liberado por la actividad enzimática que presentó tanto el extracto crudo como los biocatalizadores (Apéndice, ver sección 9.1.1).

Cuantificación de proteína

Se cuantificó la concentración de proteína soluble por medio del método de Bradford (1976) empleando como reactivo azul de Coomassie concentrado. Se agregaron 0.8 mL de extracto crudo diluido 1:80, 0.2 mL de azul de Coomassie y

DESARROLLO EXPERIMENTAL

se dejó reaccionar durante 5 min. El color generado se cuantificó espectrofotométricamente a una absorbancia de 595 nm. Un blanco sin extracto crudo fue analizado en forma paralela.

Se realizó una curva de calibración con el estándar de albúmina sérica bovina utilizando concentraciones dentro de un intervalo de 2 a 10 $\mu\text{g/mL}$ (Apéndice, ver sección 9.1.2).

5.4 Biocatálisis

5.4.1 Vía químio-enzimática

Síntesis química de dilaurato de ácido kójico

Se llevaron a cabo dos métodos para la síntesis de dilaurato de ácido kójico (DAK) y posteriormente éste sirvió como sustrato en la hidrólisis enzimática.

Esterificación de Steglich

Esta reacción se realizó siguiendo la metodología propuesta por Neises & Steglich (1978). En un matraz bola con 15 mL de diclorometano (previamente secado con tamiz molecular 4Å durante 24 h) y agitador magnético se agregaron 1 mmol de ácido kójico (AK), 4 mmol de ácido laúrico (AL) y 10 mmol de 4-N-N-dimetilaminopiridina (DMAP), es decir, 1 eq de AK, 2 eq de AL y 5 eq de DMAP. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación y en un baño de hielo mientras se adicionaron 10 mmol (5 eq) de dicitclohexilcarbodiimida (DCC). Al terminar la adición de DCC se retiró el baño de hielo, se tapó el matraz bola y se mantuvo en agitación durante 48 h a temperatura ambiente. Concluido este tiempo la mezcla de reacción se filtró para eliminar la dicitclohexilurea (DCU) insoluble producida. El filtrado se lavó 2 veces con 10 mL de HCl 0.5 N y 2 veces con 10 mL de disolución saturada de Na₂CO₃. Entre cada lavado se filtró para eliminar DCU que precipitó. La disolución orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el diclorometano por destilación a presión reducida (rotavapor Buchi R-205).

Esterificación de alcoholes por cloruros de ácido

En un matraz bola con 15 mL de hexano (secado previamente con tamiz molecular 4Å durante 24 h) se adicionaron 6 mmol de AL y 18 mmol de cloruro de oxalilo. La mezcla de reacción se calentó a reflujo con trampa de humedad durante 6 h. Posteriormente se evaporó el hexano a sequedad en rotavapor. Se adicionaron 15 mL de hexano y se volvió a evaporar en rotavapor. El producto que permaneció en el matraz bola fue el cloruro de lauroilo (CL).

DESARROLLO EXPERIMENTAL

El CL se disolvió en 15 mL de tolueno (previamente secado con tamiz molecular 4Å durante 24 h) y se adicionó 1 mmol de AK (1 eq de AK por 3 eq de CL), 0.2 mmol (0.1 eq) de DMAP. La mezcla de reacción se calentó a reflujo con trampa de humedad durante 12 h. Después la mezcla de reacción se filtró y se lavó 2 veces con 10 mL de HCl al 10 %, 2 veces con 10 mL de disolución saturada de Na₂CO₃ y por último con 10 mL de disolución saturada de NaCl. La disolución orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el tolueno a sequedad en rotavapor.

Purificación del dilaurato de ácido kójico

El DAK se purificó por cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) utilizando cromatoplasmas preparativas de sílice gel G/UV254 20 x 20 cm de 1.0 mm de espesor. La fase móvil que se empleó consistió en hexano/acetato de etilo/diclorometano 70:20:10 y se reveló con luz ultravioleta (Camag 254 – 365 nm).

Reacción estándar de hidrólisis enzimática

Se dio el nombre de reacción estándar a las condiciones que fueron constantes independientemente del biocatalizador y el solvente orgánico ensayados. Primero se seleccionó el solvente apropiado para cada biocatalizador (según pruebas de estabilidad operacional, ver sección 5.3.6). La cantidad de biocatalizador usado fueron los miligramos equivalentes a 15 U de actividad o 48 mg en el caso de biocatalizadores que presentaron actividad menor a 310 U/g.

Se llevó a cabo la reacción estándar de hidrólisis en viales ámbar de 8 mL con tapón de rosca, a los cuales, se agregaron 0.250 mL de solvente con concentración de 80 mM de DAK, 0.750 mL de buffer de fosfatos (pH 7, 50 mM) y el biocatalizador, se dejó reaccionar durante 48 h, a 37 °C y 250 rpm en agitación orbital (condiciones propuestas por Vergara-Barroso, 2010). Se evaluó una reacción blanco, la cual, consistió de una reacción estándar sin biocatalizador.

5.4.2 Esterificación

Reacción estándar de esterificación enzimática

Se establecieron condiciones para la reacción de esterificación y, al igual que la reacción de hidrólisis, los componentes que variaron fueron el biocatalizador y el solvente orgánico. Se eligió el solvente orgánico apropiado para cada biocatalizador. En cada ensayo se agregaron los miligramos de biocatalizador equivalentes a 30 U de actividad o 95 mg en el caso de biocatalizadores que presentaron actividad menor a 310 U/g (con el fin de evitar sobresaturación del medio de reacción).

La reacción estándar de esterificación se llevó a cabo en viales ámbar de 8 mL con tapón de rosca, a los cuales, se agregaron 1 mL de solvente orgánico seco a_w 0.33 con concentración de 90 mM de AL y 360 mM de AK (suspendido), 250 mg de tamiz molecular 4Å y el biocatalizador (la concentración de sustratos es de acuerdo a lo propuesto por Liu & Shaw, 1998). Se cerró herméticamente y se dejó reaccionar durante 48 h, a 37 °C y 250 rpm en agitación orbital. Se evaluó una reacción blanco, la cual, consistió de una reacción estándar sin biocatalizador.

5.4.3 Cromatografía en capa fina de las reacciones de biocatálisis

Se utilizó cromatografía en capa fina (CCF) para la visualizar la producción de 7-O-lauroilo de ácido kójico (7MAK) en los ensayos después de 48 h. Se utilizaron cromatoplasmas de sílica gel G/UV₂₅₄ 20 x 20 cm y 0.2 mm de espesor, como fase móvil se empleó una mezcla de hexano/acetato de etilo/diclorometano 70:25:5, se reveló con luz ultravioleta y posteriormente con DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). El DPPH es un radical estable que presenta coloración púrpura. Al reaccionar con un compuesto antioxidante se reduce el número de radicales libres y esto visualmente se verifica como una decoloración de púrpura a amarillo. De esta forma es posible visualizar si un compuesto es antioxidante.

5.4.4 Rendimiento de las biocatálisis por HPLC

El análisis de los productos de biocatálisis para calcular el rendimiento de la reacción se llevó a cabo en un equipo HPLC marca Waters 1525, acoplado a detector de absorción UV Waters 2487 de absorbancia (λ). El sistema HPLC está compuesto por una Bomba Binaria Waters 1525, un calentador de columna y la inyección de la muestra es automática. El sistema se controló mediante el software Breeze. Para la separación se utilizó la columna de 3.9 x 155 mm Waters Symetry® C185 μm .

Se emplearon dos fases móviles: la fase A consistió en ácido acético al 0.2 % y la fase B consistió en metanol. Se estableció un tiempo de análisis de 25 min. Estándares y muestras se corrieron con el método que se presenta en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Método para correr estándares y muestras en HPLC.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% A	% B
0	0.5	50	50
16	0.5	5	95
25	0.5	50	50

A una absorbancia $\lambda = 272 \text{ nm}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Curvas de calibración

Para elaborar la curva de calibración de 7MAK se prepararon disoluciones dentro de un intervalo de concentraciones de 0 a 3 mg/mL en metanol/ácido acético al 0.2 %, 95:5. Se detectó un tiempo de retención alrededor de los 21.1 min. (Apéndice, ver sección 9.1.3)

Se realizó una curva de calibración con el estándar de AK utilizando concentraciones dentro de un intervalo de 0 a 5 mg/mL en metanol/ácido acético al 0.2 %, 50:50. El tiempo de retención para el AK se halló alrededor de los 2.5 min. (Apéndice, ver sección 9.1.2)

Acondicionamiento y análisis de las muestras

Se analizaron las muestras en las que, mediante CCF, se detectó la producción de 7MAK.

El acondicionamiento previo consistió en la extracción no selectiva del 7MAK, para realizarla se agregaron 4 mL de acetonitrilo a los ensayos de biocatálisis y se agitó en vortéx 30 s. Inmediatamente la fase orgánica se separó del biocatalizador y del tamiz molecular mediante filtración en papel filtro No. 1 (Whatman). Posteriormente se evaporó el solvente de la fracción orgánica por destilación a presión reducida en rotavapor.

Una vez concentrados y secos los productos de las reacciones, se pesaron 5 mg y se aforaron a 1 mL con metanol/ácido acético al 0.2%, 95:5. Se inyectaron 20 μ L de cada una de las muestras en el equipo HPLC.

Se utilizaron los cromatogramas de las muestras y las curvas de calibración de los estándares para calcular el rendimiento, considerando que el reactivo en menor proporción (reactivo limitante) fueron el DAK en la hidrólisis y el AL en la esterificación.

5.4.5 Purificación de 7-O-lauroilo de ácido kójico

Kobayashi *et al* (2001) propusieron una metodología simple para purificar el 7MAK, dicha metodología fue adaptada a este trabajo.

Se juntaron los productos de las réplicas de cada ensayo de biocatálisis. Se disolvieron o suspendieron en 5 mL de acetonitrilo y se filtró con papel filtro No. 1. El filtrado se almacenó durante 2 días a 4 °C. Durante este tiempo el 7MAK recrystalizó. Posteriormente se filtró y el sólido se lavó 5 veces con agua. El sólido se volvió a recrystalizar en acetonitrilo y después en metanol. Una vez purificado se analizó por Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H) en las instalaciones de la USAI, Facultad de Química, por personal calificado (Apéndice, ver sección 9.2).

DESARROLLO EXPERIMENTAL

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

6. Resultados y discusión

6.1 Biocatalizadores

6.1.1 Cutinasa ANID_07541 de *Aspergillus nidulans* PW1

La cutinasa ANID_07541 de *A. nidulans* PW1 ha sido objeto de investigación de anteriores trabajos. La producción y purificación de esta enzima se realizó de acuerdo a lo descrito por Castro-Ochoa (2011) y la inmovilización en Accurel MP 1000 se llevó a cabo según lo reportado por Vergara-Barroso (2010).

Como resultado de la secuenciación del genoma *A. nidulans* se han encontrado en el mismo 45 secuencias de carboxilesterasas (Peña-Montes, 2009). Por lo general, no todas se expresan al mismo tiempo y, en contraparte, no ocurre que sólo una se exprese. Considerando lo anterior, es válido plantearse la siguiente pregunta ¿cómo se logró la inmovilización solamente de la cutinasa ANID_07541 de *A. nidulans* PW1? La solución está dada por las siguientes tres razones: 1) la cutinasa es una enzima extracelular, 2) se agregó un inductor génico de la cutinasa y 3) la inmovilización es selectiva (Castro-Ochoa, 2011; Vergara-Barroso, 2010). Dichos puntos se explican a continuación:

- Como ya se mencionó, la cutinasa es una enzima extracelular, esto significa que sólo se tiene que trabajar con el extracto crudo dejando a un lado las células y todo lo que ocurre en sus interiores. Además, esta restricción implica el empleo de una metodología sencilla para su extracción y purificación.
- La inhibición o inducción de la expresión génica está fuertemente influenciada por los nutrientes en el medio circundante. Por lo tanto, es comprensible que exista una fuerte relación entre los componentes del medio de cultivo y la secreción de enzimas en una fermentación (Cohen, 1973; Katz *et al.*, 2000). En base a esta premisa se modificó el medio mínimo que describe Käffer (1977) dando origen al medio optimizado descrito por Peña-Montes (2001) y Castro-Ochoa (2011), en donde se observó efecto inductor del aceite de olivo sobre la producción de la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

cutinasa. En estos trabajos previos del grupo de investigación, se han caracterizado e identificado 3 enzimas del extracto crudo de *A. nidulans* crecido en el medio optimizado: una corresponde a la proteasa alcalina PrtA (37 kDa), la otra a la cutinasa ANID_07541 (29 kDa) y la última a un producto de procesamiento post-traducciona de ANID_07541 (22 kDa); y la mayor parte de la actividad de carboxilesterasa está dada por la cutinasa ANID_07541 (Castro-Ochoa; 2011).

- La adsorción de las enzimas en Accurel MP 1000 está dada por interacciones hidrofóbicas debido a que el polipropileno, material del que se compone este soporte, es de naturaleza hidrofóbica y no iónica (Gitlese *et al*, 1997). Esto hace suponer que las condiciones de inmovilización, en especial el pH (que debe ser cercano al punto isoeléctrico), promueven el carácter hidrofóbico en la cutinasa, para que se adsorba selectivamente en el Accurel MP 1000.

En el presente trabajo únicamente se planteó la reproducción de la metodología necesaria para la inmovilización de la cutinasa ANID_07541 de *A. nidulans* PW1 y se llevó a cabo de acuerdo a los trabajos ya mencionados.

Rendimiento de inmovilización y pérdida de funcionalidad de CutAn

Se inmovilizaron dos lotes de CutAn, a los que se les determinó la actividad enzimática y la cantidad de proteína (ver sección 5.3.7), los cálculos promedio realizados sobre el extracto crudo se muestran en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Actividad enzimática y concentración de proteína libre en el extracto crudo.

Tiempo (min)	Concentración de proteína (mg/mL)	Proteína residual (%)	Actividad enzimática (U/mL)	Actividad residual (%)
0	0.186	100	12.96	100
180	0.165	89	3.12	24

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los datos de la Tabla 6.1 se calculó el rendimiento de inmovilización, el cual, resulta obvio, sin embargo, hay que considerar que esos datos se calcularon en base a la proteína y actividad remanente en el extracto crudo. Estos rendimientos se muestran en la Tabla 6.2

Tabla 6.2. Rendimientos de proteína y actividad enzimática en la inmovilización, respecto al extracto crudo.

	Rendimiento de Inmovilización (%)
Cantidad de proteína	11
Actividad enzimática	76

Los datos de la Tabla 6.2 indican que se adsorbió el 11 % de la proteína soluble (0.037 mg/mL) y si toda esa proteína es cutinasa entonces esa cantidad equivale al 76 % de la actividad enzimática total (9.84 U/mL). Es cierto que toda la proteína adsorbida no es cutinasa, sin embargo, aunque no se cuantifico, ésta debe ser la mayoritaria pues Vergara-Barroso (2010) observó selectividad en la adsorción, además, la adsorción selectiva puede conducir a la purificación parcial de la enzima (Paiva *et al*, 2000). No obstante, como ya se mencionó, estos datos se midieron al extracto crudo y por ende, no manifiestan directamente lo que ocurrió en el biocatalizador CutAn. Por esta razón se midió la actividad enzimática de CutAn y en base a esa medición se calculó la pérdida de funcionalidad que se muestra en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3. Pérdida de funcionalidad de CutAn en el proceso de inmovilización.

Actividad del biocatalizador CutAn		Pérdida de funcionalidad
Teórica* = 530 U/g	Experimental = 340 U/g	27 %

*Si el 76 % de actividad enzimática se adsorbiera correctamente, el biocatalizador CutAn tendría una actividad de 530 U/g. Se consideró que para 1 mL de extracto crudo con 12.96 U de actividad se utilizaron 0.0186 g de Accurel MP 1000 (se obtiene de la relación 1 g de Accurel para 50 mL de extracto crudo con concentración de proteína 0.2 mg/mL, ver sección 5.3.1 Inmovilización).

En el proceso de inmovilización por adsorción puede haber varias causas de pérdida de funcionalidad, entre éstas, se citan las siguientes: 1) la inmovilización

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

puede dar lugar a la desnaturalización o desactivación de la enzima, 2) la unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al sitio activo está impedido, y 3) la difusión de los sustratos hacia el sitio activo de la enzima puede estar impedida por resistencias externas o internas (Arroyo, 1998). Algunos problemas relacionados a los puntos mencionados, se detallan a continuación:

- Dado que la interacción soporte-enzima se puede dar, hipotéticamente, en cualquier parte de la cutinasa, cabe la posibilidad de que el acceso al sitio activo sea bloqueado por el soporte. O bien, en la prueba de actividad enzimática, dado que el Accurel MP 1000 (hidrofóbico y no iónico) no es afín al medio de reacción (buffer de fosfatos pH 7, 50 mM), se dificulta la difusión del sustrato ya que debe atravesar la película líquida estacionaria (capa de Nernst o de difusión) que rodea el soporte, que en estos casos es muy gruesa, perturbando en gran medida el valor de la actividad del biocatalizador CutAn. Por otra parte, la difusión del sustrato también depende del lugar dentro del soporte donde se adsorbió la cutinasa, debido a que el sustrato tiene que atravesar el interior del Accurel MP 1000 para llegar a donde se encuentra la cutinasa, mientras la cutinasa se halle más lejos de la superficie del Accurel MP 1000 más complicada será la difusión del sustrato, este inconveniente se puede corregir al disminuir el tamaño del soporte, aumentar la concentración de sustrato o incrementar la agitación (Arroyo, 1998).

En la Tabla 6.4 se calculó el rendimiento de la inmovilización en base a la actividad enzimática de CutAn. Se consideró tanto la actividad de la cutinasa que no se adsorbe (24%) así como la pérdida de funcionalidad (27%).

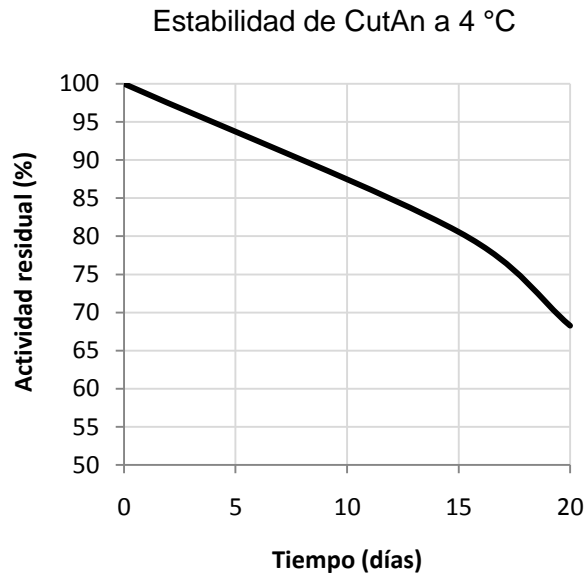
Tabla 6.4. Rendimiento de actividad enzimática en la inmovilización respecto al biocatalizador CutAn.

Actividad enzimática del biocatalizador CutAn		Rendimiento de Inmovilización (%)
Teórica* = 697 U/g	Experimental = 340 U/g	49

*Si el 100 % de actividad enzimática se adsorbiera correctamente, el biocatalizador CutAn tendría una actividad de 697 U/g. *Ídem*.

Estabilidad del biocatalizador CutAn en almacenamiento a 4 °C

Esta prueba forma parte de la caracterización del biocatalizador, para realizarla CutAn se almacenó a 4 °C, durante 20 días y en este lapso se realizaron mediciones de la actividad residual. El comportamiento se muestra en la Gráfica 6.1, en donde se observa que CutAn tuvo un decremento equivalente a una tercera parte de su actividad original. Siempre es deseable generar biocatalizadores que mantengan su actividad enzimática estable durante largos periodos de almacenamiento, ya que esto podría ser crucial para aplicaciones industriales. En definitiva, la actividad de la cutinasa (como la de cualquier otra enzima) no es permanente, sin embargo, dado que se encuentra inmovilizada el decremento no ocurre en forma acentuada.



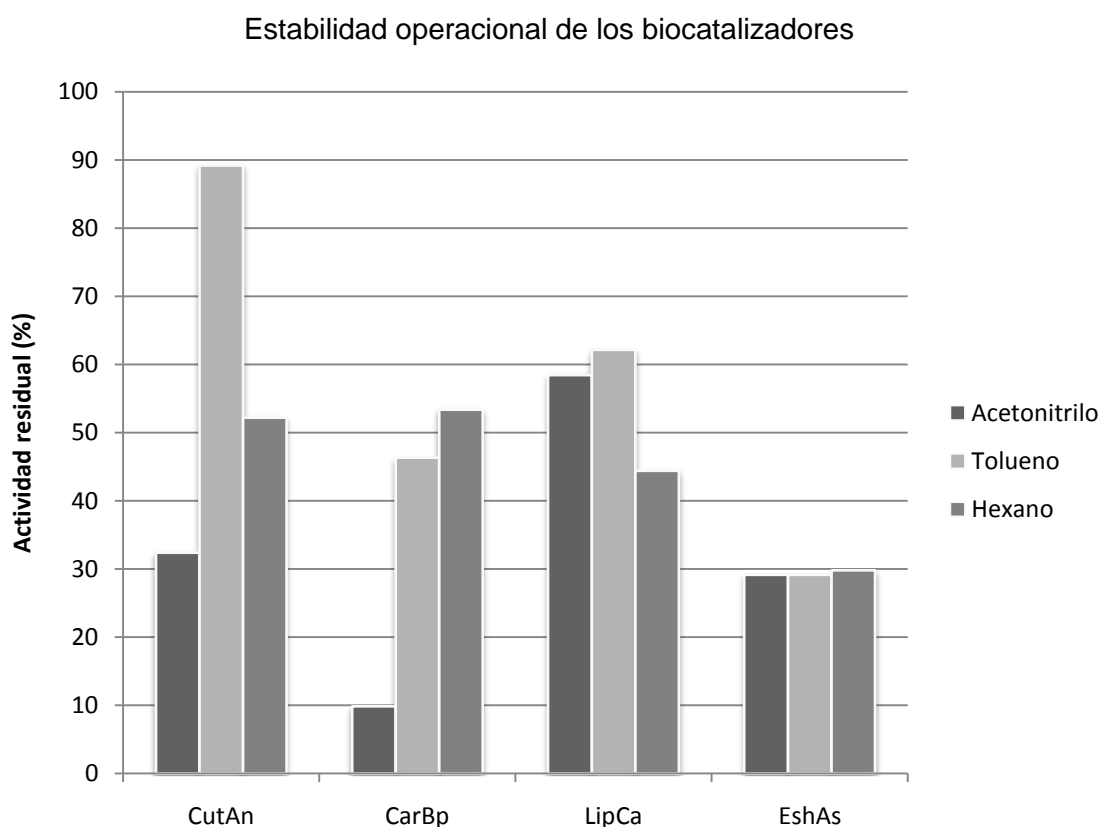
Gráfica 6.1. El biocatalizador CutAn se almacenó a 4 °C durante 20 días, en la figura se observa la variación de la actividad respecto a la inicial.

6.1.2 Estabilidad operacional de los biocatalizadores por efecto del solvente orgánico

Un prerrequisito importante para el desarrollo de biocatálisis en medio orgánico es demostrar que las enzimas sean relativamente estables en solventes orgánicos (Pastorino *et al*, 2004). Es por eso que se realizó una prueba en donde los cinco

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

biocatalizadores se suspendieron en solventes orgánicos en las condiciones descritas en la sección 5.3.6. Además de observar la estabilidad de los biocatalizadores, esta prueba permitió elegir el solvente orgánico, en el cual, se efectuarían las reacciones de biocatálisis. Los resultados se muestran en la Gráfica 6.2.



Gráfica 6.2. Estabilidad de los biocatalizadores después de estar inmersos durante 48 h en solventes orgánicos. Se reportó que el biocatalizador EstAn presenta mejor estabilidad en hexano (Mondragón-Tintor, comunicación personal).

Las investigaciones realizadas sobre la correlación entre la actividad enzimática del biocatalizador y los solventes orgánicos como medio de reacción, involucra parámetros como la actividad acuosa a_w y el coeficiente de partición $\log P_{oct}$ (Cardenas *et al*, 2001). Se ha observado que en medio orgánico la estructura de las enzimas es más rígida que en medio acuoso, esto permite conservar su conformación y por lo tanto mejora su estabilidad. En los medios no acuosos, el agua ligada a la enzima bien puede ser la única en el sistema. Esta hidratación es

necesaria para mantener la integridad estructural de la enzima y por lo tanto su poder catalítico. La estabilidad de la enzima podría verse afectada por solventes orgánicos hidrofílicos ($\log P_{oct} \leq 2$) ya que éstos podrían extraer el agua enlazada a la enzima. Sin embargo, solventes orgánicos hidrofóbicos ($a_w < 1$, $\log P_{oct} > 2$) son adecuados para llevar a cabo biocatálisis, debido a que éstos solventes por lo general no desplazan el agua que está enlazada a las enzimas. Hay que considerar que la sensibilidad de la enzima al $\log P_{oct}$ del solvente, al igual que otros factores, depende en gran medida de la fuente de la enzima (Yahya *et al*, 1998; Paiva *et al*, 2000).

Esta prueba se realizó con los solventes mostrados en la Gráfica 6.2 debido a que en acetonitrilo se ha reportado la biosíntesis de 7MAK (Liu & Shaw, 1998; Kobayashi *et al*, 2001; Chen *et al*, 2002), en tolueno se ha reportado la producción de 7MAK por hidrólisis enzimática de DAK (Vergara-Barroso, 2010) y el hexano es un solvente orgánico muy empleado en la biosíntesis de ésteres (Yahya *et al*, 1998). El acetonitrilo que tiene un valor $\log P_{oct} = -0.34$ fue el solvente en donde los biocatalizadores tuvieron mayor pérdida de actividad. CutAn y LipCa tuvieron mejor estabilidad en tolueno ($\log P_{oct} = 2.73$). En cambio CarBp y EshAs presentaron mejor estabilidad en hexano ($\log P_{oct} = 3.5$). Mondragón-Tintor (comunicación personal) reportó que EstAn es más estable en hexano.

6.1.3 Actividad enzimática de los biocatalizadores

En la Tabla 6.5 se muestra la actividad enzimática de los biocatalizadores en el momento que se realizaron los ensayos de biocatálisis.

Tabla 6.5. Actividad enzimática de los biocatalizadores.

Biocatalizador	Actividad (U/g)
CutAn	317
EstAn	92
CarBp	107
LipCa	1648
EshAs	6968

6.2 Biocatálisis

6.2.1 Vía químio-enzimática

Síntesis química de dilaurato de ácido kójico

Se probaron dos métodos para sintetizar el DAK. Ambos son variantes de la reacción de sustitución nucleofílica en el acilo (en la modalidad de alcoholisis). Esta reacción ocurre en dos pasos: el primero es la adición de un nucleófilo al grupo carbonilo y el segundo es la eliminación de uno de los dos sustituyentes unidos originalmente al carbono del carbonilo. Ambos pasos afectan la rapidez general de la reacción y el primero suele ser el paso limitante de la rapidez. Tanto los factores estéricos como los electrónicos son importantes para determinar la reactividad. Como consecuencia de la diferencia de reactividad entre los derivados de ácidos carboxílicos, es usualmente posible transformar un derivado de ácido más reactivo en otro menos reactivo (McMurry, 2008).

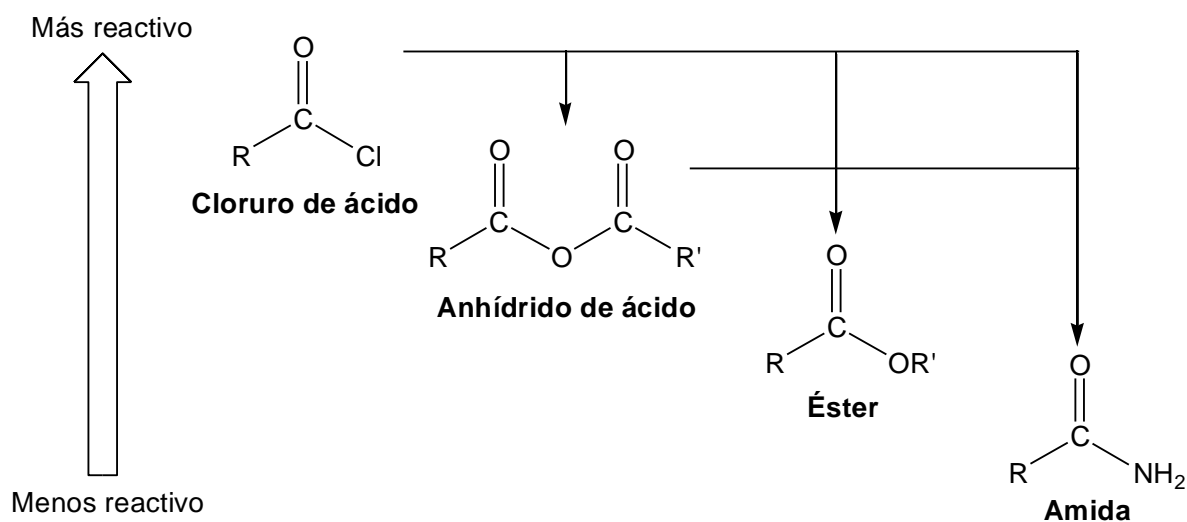
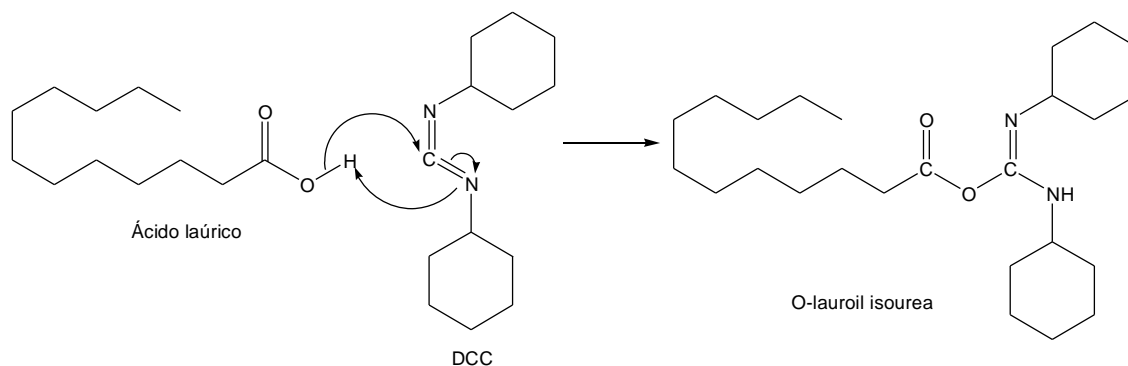


Figura 6.1. Reactividad e interconversiones de los derivados de ácidos carboxílicos.

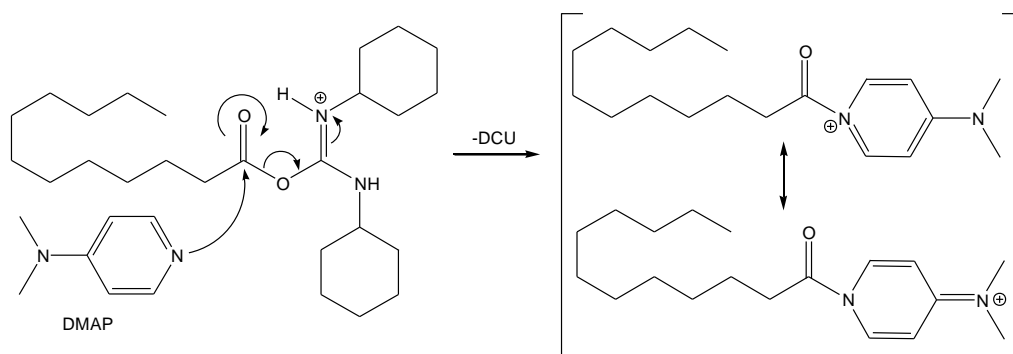
Esterificación de Steglich

En esta reacción el reactivo de acoplamiento DCC y AL reaccionan formando el intermediario O-lauroil isourea, la cual, posee una reactividad similar al anhídrido del ácido laúrico.

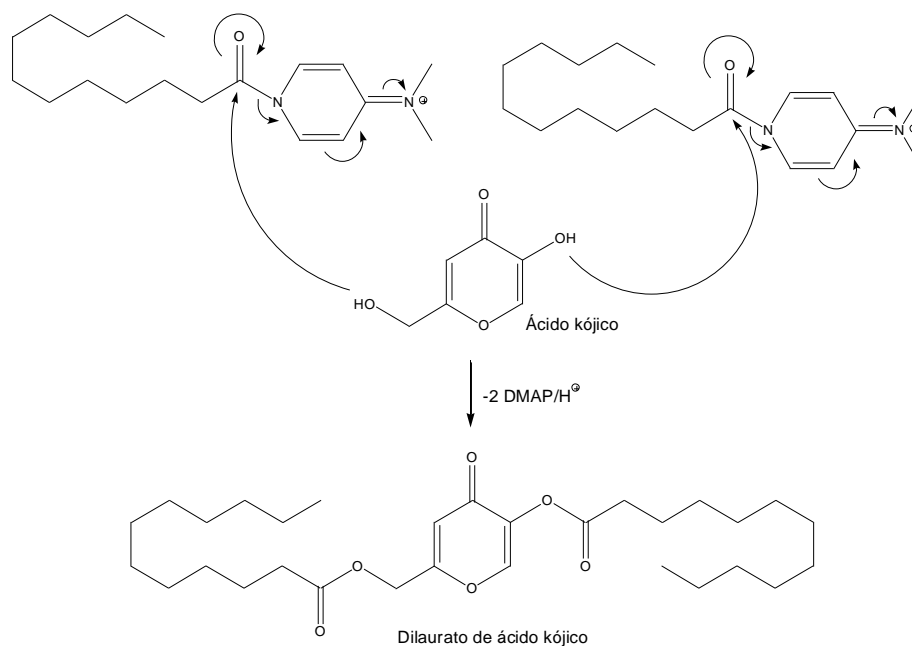
RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Para la eficiente formación del DAK es crucial la adición del catalizador de DMAP. DMAP es un nucleófilo que reacciona con O-lauroil isourea produciendo un intermediario que reacciona rápidamente con AK.



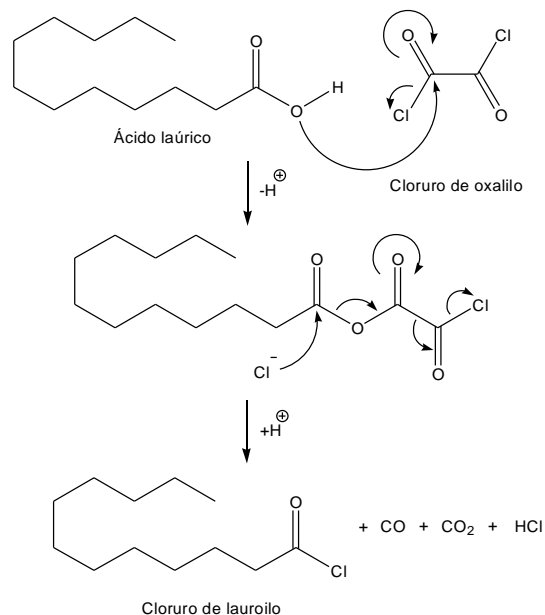
La adición de DMAP suprime reacciones secundarias y funciona como transferidor del grupo lauroilo hacia el AK produciendo DAK, vía alcoholisis.



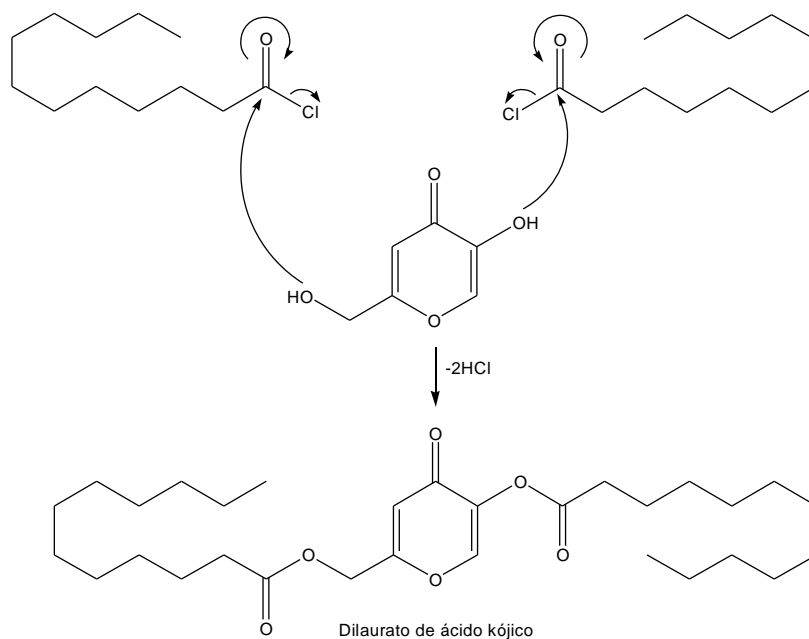
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esterificación de alcoholes por cloruros de ácido

Formación de CL: los ácidos carboxílicos se convierten en cloruros de ácido tratándolos con cloruro de tionilo SOCl_2 o cloruro de oxalilo $(\text{COCl})_2$.



Esterificación del AK por el CL: esta reacción de alcoholisis se inicia con el ataque del AK sobre el grupo carbonilo del CL. El intermediario sufre la eliminación de Cl^- y H^+ , y el producto es el DAK más HCl . Esta reacción se efectúa en presencia de DMAP para eliminar el HCl y así se evita la posibilidad que ocurran reacciones laterales.



Comparación de los métodos para la síntesis química de dilaurato de ácido kójico

La sustitución nucleofílica en el acilo directa en un ácido carboxílico, es difícil porque el $-OH$ es un mal grupo saliente, por este motivo no es factible la reacción directa entre AK y AL para formar DAK. Sin embargo, bajo las circunstancias correctas, es posible llevar a cabo esta reacción. Esto se corroboró en los dos métodos que se realizaron, cuyos productos purificados se muestran en la CCF de Figura 6.2.

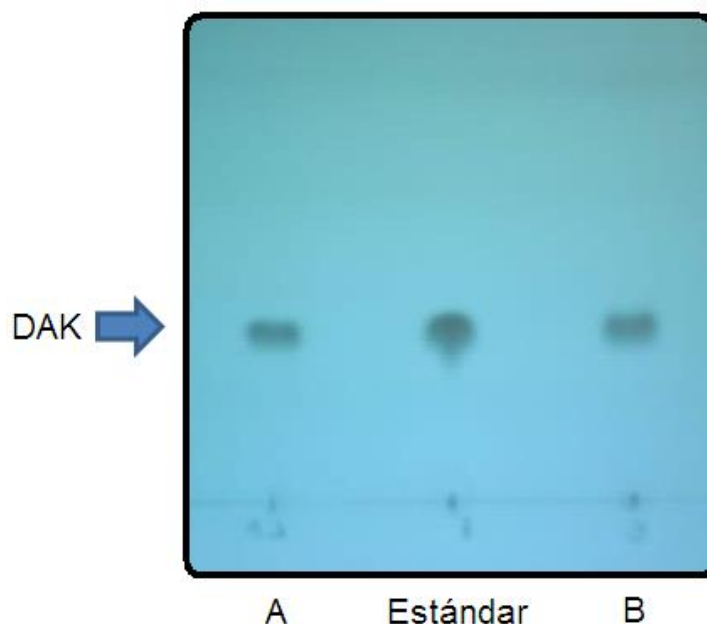


Figura 6.2. CCF del DAK sintetizado por (A) esterificación de alcoholes por cloruros de ácido y (B) esterificación de Steglich. Revelado con luz UV. Fase móvil Hexano/Acetato de etilo/Diclorometano, 70:20:10. $R_{f_{DAK}} = 0.4$.

Con el propósito de comparar y establecer cuál de los métodos es el más adecuado para la síntesis de DAK en la Tabla 6.6 se han resumido pros y contras de cada uno de éstos.

Los rendimientos bajos obtenidos con ambos métodos se deben al impedimento estérico que tiene el grupo hidróxilo fenólico en C-5 del AK, pues el impedimento estérico afecta considerablemente la reacción de alcoholisis.

La notable diferencia en los tiempos de reacción, es resultado de la diferencia de reactividades. En la esterificación de Steglich se forma un intermediario similar al anhídrido del ácido laúrico y en la esterificación de alcoholes por cloruros de ácido

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

reacciona el cloruro del ácido laúrico, por eso, aunque la reacción que experimentan es la misma (la alcoholisis), dada su reactividad, los anhídridos reaccionan más lentamente que los cloruros de ácido.

Tabla 6.6. Comparación de los métodos empleados para la síntesis de DAK.

Método	Esterificación de Steglich	Esterificación de alcoholes por cloruros de ácido
Rendimiento (%)	30	40
Tiempo total (h)	48	18
Ventajas	<ul style="list-style-type: none">- Usa reactivos cuyo manejo es fácil- La reacción procede a temperatura ambiente	<ul style="list-style-type: none">- La cantidad de productos laterales es baja- El tiempo total de reacción es corto
Desventajas	<ul style="list-style-type: none">- El tiempo de reacción es largo- Elevada cantidad de productos laterales (DCU)	<ul style="list-style-type: none">- Es un método que consta de dos etapas- Utiliza reactivos peligrosos (cloruro de oxalilo)

Aunque en la Tabla 6.6 se menciona que en el método de Steglich hay una alta cantidad de productos laterales y que en la esterificación de alcoholes por cloruros de ácido esta cantidad es baja, la realidad es que en ambos métodos se generan productos laterales cuya separación es difícil, por esta razón la purificación de DAK se tuvo que realizar mediante CCFP.

El mejor método para sintetizar el DAK es la esterificación de alcoholes por cloruros de ácido debido a que se obtiene un mayor rendimiento en un tiempo de reacción mucho menor que en la esterificación de Steglich.

Reacción estándar de hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se lleva a cabo en exceso de agua (Pastorino, 2004). En base a este criterio se realizó esta biocatálisis, además se consideraron las condiciones que Vergara-Barroso (2010) propuso al efectuar esta misma reacción con CutAn.

El DAK tiene dos esterificaciones una en C-5 y otra en C-7, la hidrólisis tiene que efectuarse regioselectivamente sobre el enlace éster del C-5 para que el derivado

resultante posea las actividades quelante, antioxidante e inhibitoria enzimática (Hsieh *et al*; 2006).

En CCF, se visualiza el 7MAK que, por su polaridad, tiene un valor de Rf que es intermedio al Rf del AK y del DAK; y al revelar con DPPH, 7MAK y AK son visibles por sus propiedades antioxidantes, mientras que DAK no se visualiza ya que no posee esa propiedad.

Las CCF de las biocatálisis se muestran en la Figura 6.3, a primera vista se observa que sólo en el ensayo con CutAn se produjo 7MAK por hidrólisis de DAK, que se manifiesta como la aparición de la señal de 7MAK, sin embargo, aun se ve la señal de DAK, lo cual, indica que hay sustrato remanente. En los demás ensayos no hubo producción de 7MAK, no obstante, se observan dos comportamientos contrastantes, por un lado, CarBp y LipCa hidrolizaron completamente el DAK (produciendo AK y AL) y en contraparte, EstAn y EshAs no hidrolizaron DAK (o la hidrólisis fue mínima). Es interesante, porque estos biocatalizadores se separan en tres grupos: Lipasas (CarBp y LipCa), Cutinasa (CutAn) y Esterasas (EstAn y EshAs). El DAK podría semejar a un diacilglicérido de cadena media, en principio este tipo de sustrato es hidrolizable por lipasas, prácticamente no hidrolizable por esterazas y un sustrato parecido al natural para las cutinasas, y el comportamiento que se observó corrobora las diferencias en la especificidad por sustrato que existe entre estos grupos de carboxilesterasas.

6.2.2 Esterificación

Reacción estándar de esterificación

La esterificación y la transesterificación se ven favorecidas en ausencia de agua o en cantidades traza (Serdakowski & Dordick, 2008; Pastorino *et al*, 2004). Este argumento fue la base para el planteamiento de la reacción de esterificación, donde la razón molar de los sustratos corresponde a lo reportado por Liu & Shaw (1998) y el tiempo, la temperatura y la agitación son idénticos a los experimentados en la reacción de hidrólisis para comparar contra ésta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

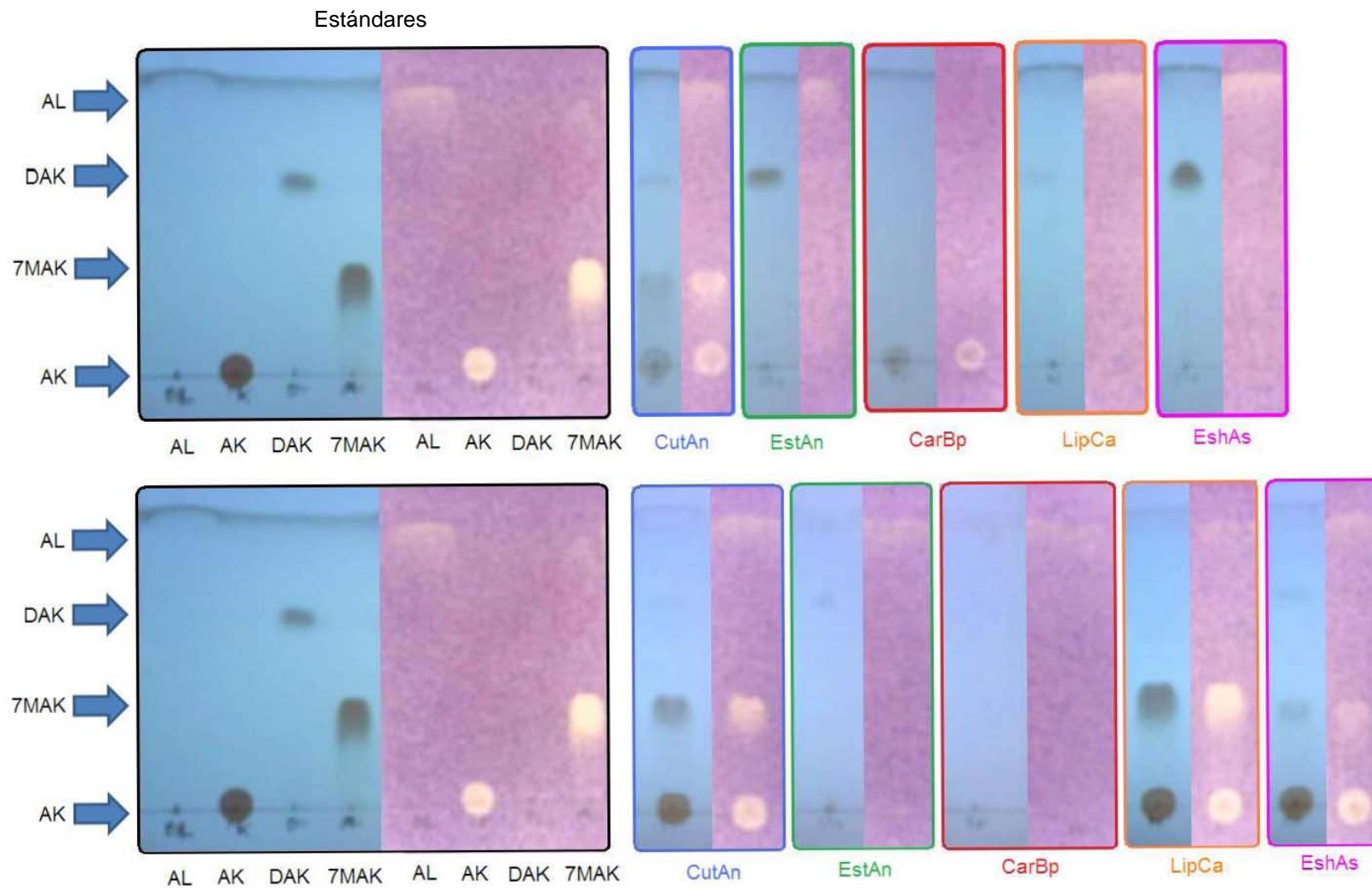


Figura 6.3. CCF de los ensayos de biocatálisis: hidrólisis (arriba) y esterificación (abajo). Revelado con luz UV (izquierda) y DPPH (derecha). Fase móvil Hexano/Acetato de etilo/Diclorometano 70:25:5. $R_{f_{AL}} = 0.9$, $R_{f_{DAK}} = 0.6$, $R_{f_{7MAK}} = 0.3$, $R_{f_{AK}} = 0$.

AK se puede esterificar en el grupo hidróxilo fenólico en C-5 o en el grupo hidróxilo primario en C-7, resultando la formación de dos regioisómeros (Raku & Tokiwa, 2003), o bien puede esterificarse en las dos posiciones generando el diéster de AK. Sin embargo, de estas tres moléculas la única que es bioactiva (quelante, antioxidante e inhibitoria enzimática) es el regioisómero esterificado en C-7.

En las CCF de la Figura 6.3 se observa que sólo en los ensayos con CutAn, LipCa y EshAs se produjo 7MAK por esterificación de AK con AL, las señales varían en cuanto a grosor y saturación, esto revela cualitativamente que la producción de 7MAK fue mayor con LipCa, intermedia con CutAn y menor con EshAs.

6.2.3 Rendimiento de las biocatálisis

Se calculó el rendimiento de los ensayos en los que se detectó la producción de 7MAK mediante CCF, en la Tabla 6.7 se muestran los rendimientos, los solventes orgánicos y la cantidad de biocatalizador empleados en cada una de las biocatálisis.

En las biocatálisis (hidrólisis o esterificación) que se llevaron a cabo, las únicas variables de un ensayo a otro fueron el solvente orgánico (que se usó como medio de reacción), la cantidad del biocatalizador (que se relaciona a la cantidad de unidades de actividad) y la naturaleza de la enzima (es decir, si es cutinasa, esterasa o lipasa, o si es de un hongo o de una bacteria, etc).

En cuanto a la hidrólisis, al parecer ninguno de los parámetros influye en la producción de 7MAK, excepto el grupo al que pertenecen las enzimas, la especificidad por sustrato de acuerdo a la reacción que naturalmente catalizan, esto se dedujo de la observación de las CCF y se discutió en la parte final de la sección 6.2.1.

Respecto a la esterificación, del análisis de las CCF se advirtió sobre las diferencias cualitativas en la producción de 7MAK, y esto se confirmó cuantitativamente al determinar el rendimiento. Por otra parte, la producción de 7MAK parece depender del solvente orgánico, ya que los mejores rendimientos se

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

observaron en tolueno, esto podría ser efecto de la relación enzima-solvente (que se analizó en la sección 6.1.2) o bien de la relación sustrato-solvente, es decir, de la solubilidad de los sustratos en el solvente orgánico. Una alta solubilidad de sustratos en solventes orgánicos resulta en elevadas velocidades de reacción (Yahya *et al*, 1998), el AL es soluble tanto en tolueno como en hexano, en cambio, aunque el AK es poco soluble en cualquiera de los dos solventes, es más soluble en tolueno que en hexano, esto se explica porque las estructuras del tolueno y del AK son más parecidas, ambas moléculas tienen estructuras cíclicas de 6 eslabones, esto no ocurre con el hexano, y por esta razón hay mejores rendimientos en tolueno.

Tabla 6.7. Rendimiento y condiciones específicas de los ensayos de biocatálisis.

Biocatalizador		CutAn	EstAn	CarBp	LipCa	EshAs
Solvente orgánico en el que se efectuó la biocatálisis		Tolueno	Hexano	Hexano	Tolueno	Hexano
Hidrólisis	Cantidad de biocatalizador (mg)	48	48	48	9.1	2.2
	Actividad equivalente (U)	15	4.4	5.1	15	15
	Rendimiento (%)	3.7 ± 1.6	-	-	-	-
Esterificación	Cantidad de biocatalizador (mg)	95	95	95	18.2	4.3
	Actividad equivalente (U)	30	8.7	10.2	30	30
	Rendimiento (%)	13.5 ± 3.9	-	-	72.8 ± 5.3	3.4 ± 0.6

Por otra parte, el rendimiento de la esterificación enzimática con LipCa es sobresaliente, por ello se debe mencionar, que si bien, ya se ha reportado la misma biocatálisis utilizando esta enzima en dos artículos previos, ninguno obtuvo un rendimiento tan alto como el que se obtuvo en este trabajo. En el primero Liu &

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Shaw (1998) reportan un rendimiento del 18.9 % y en el segundo Kobayashi *et al* (2001) reportan un 53 % después de cuatro ciclos de reutilización (aunque se debe aclarar que en este último, en vez de Novozyme[®] 435, se usó el equivalente de nombre comercial Chirazyme L-2[®]). No obstante, Chen *et al* (2002) reportó un rendimiento del 82 % con la lipasa de *Pseudomonas cepacia* marca Amano PS[®], aplicando un diseño estadístico llamado Metodología de Superficies de Respuesta.

El 7MAK recristalizado se analizó por RMN ¹H. Los datos espectroscópicos obtenidos (Apéndice, ver sección 9.2) son los mismos que describen Kobayashi *et al* (2001) y Vergara-Barroso (2010), lo cual, corrobora la producción del mismo compuesto.

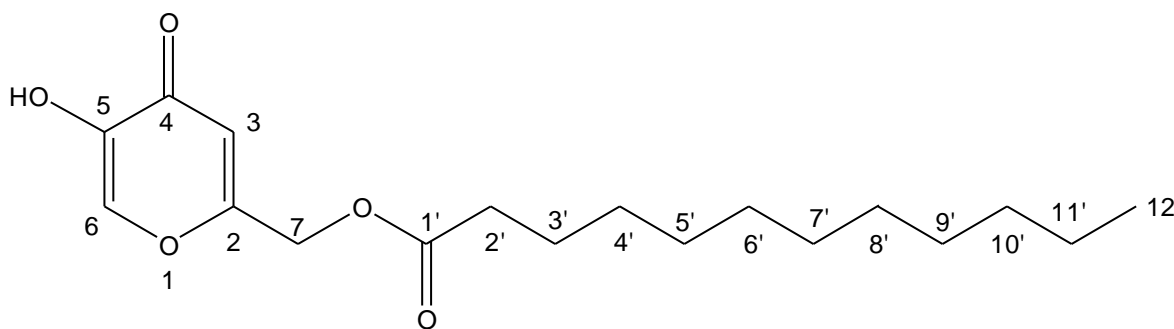


Figura 6.4. 7-O-lauroilo de ácido kójico

RMN ¹H (CDCl₃), 400 MHz, δ ppm: 0.88 (3H, t, J=6.4Hz, H-12'); 1.26 (16H, m, H-4'-11'); 1.65 (2H, m, H-3'); 2.38 (2H, t, J=7.5 Hz, H-2'); 4.93 (2H, s, H-7); 6.51 (1H, s, H-3); 7,86 (1H, s, H-6).

El método más conveniente para la producción de 7MAK es la esterificación enzimática, ya que se obtuvieron mejores rendimientos y además implica una metodología mucho más fácil de realizar en comparación con la vía quimio-enzimática.

7. Conclusiones

CONCLUSIONES

- ✓ Se efectuó la producción de 7-O-lauroilo de ácido kójico mediante biocatálisis regioselectiva. Este compuesto presentó carácter hidrofóbico y actividad antioxidante.
- ✓ Se produjo y purificó la cutinasa ANID_07541 de *A. nidulans*, ésta se inmovilizó en Accurel MP 1000. Este biocatalizador mostró regioselectividad en la producción de 7-O-lauroilo de ácido kójico, tanto en la hidrólisis (vía quimio-enzimática) como en la esterificación enzimática.
- ✓ Otros dos biocatalizadores mostraron ser adecuados para la producción de 7-O-lauroilo de ácido kójico por esterificación enzimática: la lipasa de *C. antarctica* y las esterasas-hemicelulasas de *Aspergillus* sp., en donde el mayor rendimiento lo obtuvo la lipasa.
- ✓ En la hidrólisis (vía quimio-enzimática) se observó especificidad por sustrato, mientras que en la esterificación enzimática se observó influencia del solvente orgánico que se usó como medio de reacción. Siendo la esterificación enzimática el método más conveniente para la producción de 7-O-lauroilo de ácido kójico.
- ✓ La cutinasa de *A. nidulans* y la lipasa de *C. antarctica* mostraron estabilidad operacional en tolueno, mientras que la lipasa de *B. pumillus* y las esterasas-hemicelulasas de *A. sp.* lo hicieron en hexano.
- ✓ El mejor método para la síntesis química del dilaurato de ácido kójico (vía quimio-enzimática) fue la esterificación de alcoholes por cloruros de ácido, ya que obtuvo mejor rendimiento y menor tiempo de reacción que la esterificación de Steglich. Los resultados dependieron de la reactividad y del impedimento estérico de los reactivos.

8. Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- ✓ **Arroyo M.** (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*. **39(2)**: 23 – 39.
- ✓ **Borreguero I., Carvalho C.M.L., Cabral J.M.S, Sinisterra J.V., Alcántara A.R.** (2001) Enantioselective properties of *Fusarium solani pisi* cutinase on transesterification of acyclic diols: activity and stability evaluation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **11**: 613 – 622.
- ✓ **Bornscheuer U.T., Kazlauska R.J.** (2006) *Hydrolases in organic synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*. 2° ed. Wiley - VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim. pp. 61 – 74.
- ✓ **Bosley J.A., Peilow A.D.** (1997). Immobilization of lipases on porous polypropylene: reduction in esterification efficiency at low loading. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **74**: 107 – 111.
- ✓ **Bradford M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248 – 254.
- ✓ **Burdock G.A., Soni M.G., Carabin I.G.** (2001). Evaluation of health aspects of kojic acid in food. *Regulatory toxicology and Pharmacology*. **33**: 80 – 101.
- ✓ **Bustos I.** (1995). Aislamiento selectivo de un microorganismo productor de lipasa proveniente de un ambiente extremo. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- ✓ **Cardenas F., de Castro M.S., Sanchez-Montero J.M., Sinisterra J.V., Valmaseda M., Elson S.W., Alvarez E.** (2001). Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*. **28**: 145–154.
- ✓ **Castro-Ochoa D., Peña-Montes C; Alva-Gasca A; González-Canto A. y Farrés A.** (2011). AN CUT1, a Novel Cutinase, from *Aspergillus nidulans*. *Biores. Technol.* En revisión.
- ✓ **Ceni G., Costa da Silva P., Lerin L., J. Vladimir Oliveira, Geciane Toniazzo, Treichel H., Oestreicher E., Oliveira D.** (2011). Ultrasound-assisted enzymatic transesterification of methyl benzoate and glycerol to 1-glycerol benzoate in organic solvent. *Enzyme and Microbial Technology*. **48**: 169–174.
- ✓ **Chen C., Liu K., Lou Y., Shieh C.** (2002). Optimisation of kojic acid monolaurate synthesis with lipase PS from *Pseudomonas cepacia*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **82**: 601-605.
- ✓ **Cohen B.L.** (1973). Regulation of intracellular and extracellular neutral and alkaline proteases in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*. **79**: 311 – 320.
- ✓ **Fojan P., Jonson P.H., Petersen M.T.N, Petersen S.B.** (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie* **82**: 1033 – 1041.
- ✓ **Fontes P.T., Alves G.** (2007). Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*. **41**: 613–619.
- ✓ **Foresti M.L., Ferreira M.L.** (2004). Ethanol pretreatment effect and particle diameter issues on the adsorption of *Candida rugosa* lipase onto polypropylene powder. *Applied Surface Science*. **238**: 86-90.
- ✓ **Gitlesen T., Bauer M., Adlercreutz P.** (1997). Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1345**: 188 – 196.
- ✓ **Horii K., Adachi T., Tanino T., Tanaka T., Kotaka A., Sahara H., Hashimoto T., Kuratani N., Shibasaki S., Ogino C., Noda H., Hata Y, Ueda M., Kondo A.** (2010) Fatty acid production from butter using novel cutinase-displaying yeast. *Enzyme and Microbial Technology*. **46**: 194–199.
- ✓ **Hsieh H., Giridhar R., Wu W.** (2006) Regioselective formation of kojic acid-7- α -D-glucopyranoside by whole cells of mutated *Xanthomonas campestris*. *Enzyme and Microbial Technology*. **40**: 324–328.
- ✓ **IUBMB Nomenclature** [en línea] En: Enzyme nomenclature. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) on the

BIBLIOGRAFÍA

- Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
- ✓ **Käfer E.** (1977) Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Advances in Genetics*. **19**: 33 – 131.
 - ✓ **Käfer E., Hill T.W.** (2001). Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Newsletter*. **48**: 20 - 21.
 - ✓ **Katz M.E., Masoumi A. Burrows S.R., Shirliff C.G., Cheetham B.F.** (2000). The *Aspergillus nidulans* *xprF* gene encodes a hexokinase-like protein involved in the regulation of extracellular proteases. *Genetics*. **156**: 1559 – 1571.
 - ✓ **Kobayashi T., Adachi S., Nakanishi K., Matsuno R.** (2001) Semi-continuous production of lauroyl kojic acid through lipase-catalyzed condensation in acetonitrile. *Biochemical Engineering Journal* **9**: 85-89.
 - ✓ **Koskinen A., Klivaniv A.** (1998) Enzimatic reactions in organic media. Reino Unido, Ed. Blackie Academic and Professional.
 - ✓ **Liu K.J., Shaw J.F.**, (1998) Lipase-catalyzed synthesis of kojic acid esters in organic solvents. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **75 (11)**: 1507 – 1512.
 - ✓ **MacCabe A.P., Orejas M., Tamayo E.N., Villanueva A., Ramón D.** (2002). Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biotechnology* **96**: 43–54.
 - ✓ **McMurry J.** (2008) *Química Orgánica*. 7ª ed. México, Cengage Learning Editores. Págs. 785-840.
 - ✓ **Nawani N., Singh R., Kaur J.** (2006). Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electronic Journal of Biotechnology*. **9 (5)**: 559 – 565
 - ✓ **Neises B., Steglich W.** (1978) Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **17**: 522-524.
 - ✓ **Noh J., Kwak S., Seo H., Seo J., Kim B., Lee Y.** (2009) Kojic acid–amino acid conjugates as tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **19**: 5586–5589.
 - ✓ **Paiva A.L., Balcao V.M., Malcata X.** (2000). Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. **27**: 187 – 204.
 - ✓ **Pastorino L., Pioli F., Zilli M., Converti A., Nicolini C.** (2004) Lipase-catalyzed degradation of poly(ϵ -caprolactone). *Enzyme and Microbial Technology* **35**: 321–326.
 - ✓ **Peña-Montes C.** (2001). Producción, purificación y caracterización bioquímica de una enzima con actividad lipolítica en *Aspergillus nidulans*. Tesis. Maestría en Ciencias. Facultad de Química. UNAM
 - ✓ **Peña-Montes C., Lange S., Castro-Ochoa D., Ruiz-Noria K., Cruz-García F., Schmid R., Navarro-Ocaña A., Farrés A.** (2009). Differences in biocatalytic behavior between two variants of StcI esterase from *Aspergillus nidulans* and its potential use in biocatalysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **61 (3-4)**: 225 – 234.
 - ✓ **Raku T., Tokiwa Y.** (2003). Regioselective synthesis of kojic acid esters by *Bacillus subtilis* protease. *Biotechnology Letters*. **25**: 969 – 974.
 - ✓ **Ruiz K.** (2007) Uso de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 en biocatálisis. Tesis. Química de alimentos. Facultad de Química. UNAM.
 - ✓ **Serdakowski A. & Dordick J.** (2008) Enzyme activation for organic solvents made easy. *Trends in Biotechnology*. **26(1)**: 48 – 54.

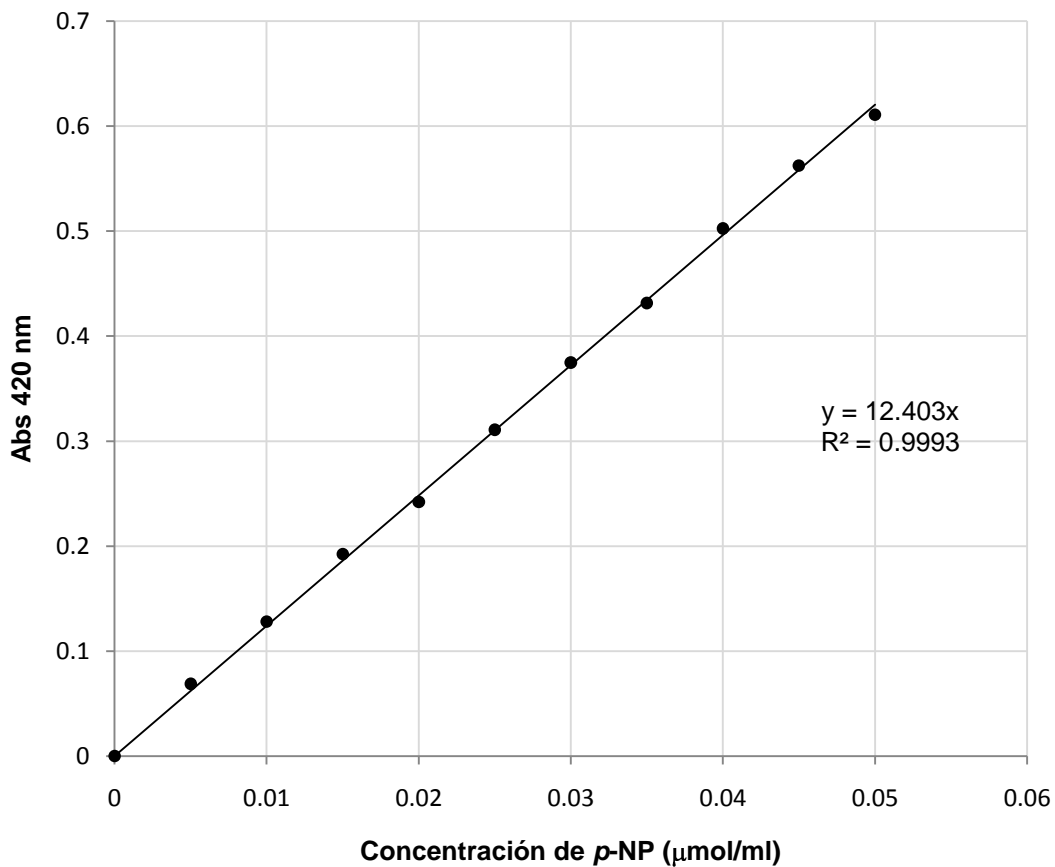
BIBLIOGRAFÍA

- ✓ **Sivozhelezov V., Bruzzese D., Pastorino L., Pechkova E., Nicolini C.** (2009) Increase of catalytic activity of lipase towards olive oil by Langmuir-film immobilization of lipase. *Enzyme and Microbial Technology*. **44**: 72–76
- ✓ **Voet D.** (2007) *Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular*. 2ª ed. México, Ed. Médica Panamericana. Págs. 312-356.
- ✓ **Volcan R., Vieira R., Peixoto B., da Silva C., Campbell S., Martins O., Ceva O.A, Guimaraes D.M.** (2008). Immobilization of a recombinant thermostable esterase (*Pf2001*) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: Isotherms, hyperactivation and purification. *Biochemical Engineering Journal*. **39**: 531 – 537.
- ✓ **Vergara-Barroso P.** (2010) *Inmovilización de carboxilesterasas a partir de extracto crudo de Aspergillus nidulans PW1*. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM.
- ✓ **Wang P., Wang Q., Fan X., Cui L., Yuan J., Chen S., Wu J.** (2009) Effects of cutinase on the enzymatic shrink-resist finishing of wool fabrics. *Enzyme and Microbial Technology*. **44**: 302–308.
- ✓ **Yahya A.R.M., Anderson W.A., Moo-Young M.** (1998) Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme and Microbial Technology*. **23**:438–450.
- ✓ **Zuñiga V.** (2004). *Inmovilización de lipasa de Bacillus pumillus GMA1*. Tesis. Química de alimentos. Facultad de Química. UNAM.

9. Apéndice

9.1 Curvas de calibración

9.1.1 Curva de calibración de *p*-nitrofenol para la cuantificación de actividad enzimática por el método Nawani *et al* (2006)



Se utilizó una solución estándar de *p*-nitrofenol ($10 \mu\text{mol/mL}$) (Sigma Aldrich)

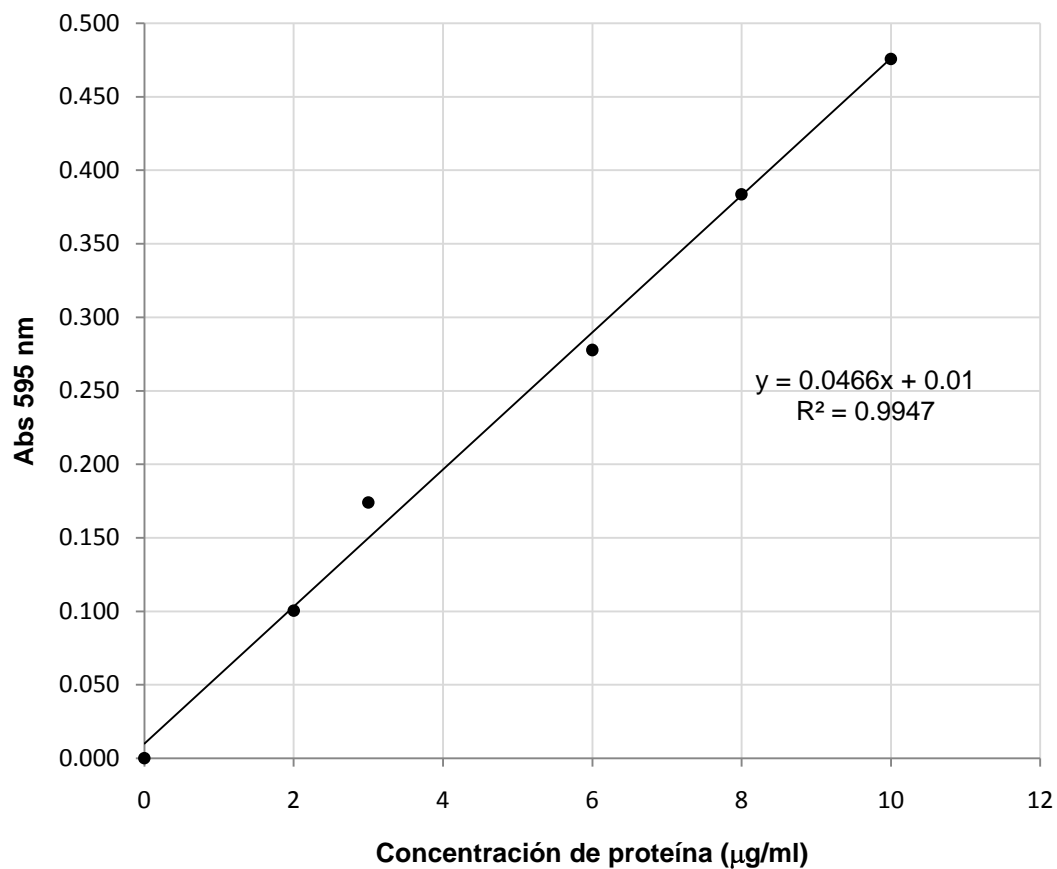
La ecuación de la recta es:

$$\text{Abs 420 nm} = 12.403 \times (\text{Concentración de } p\text{-NP})$$

De la cual:

$$\text{Concentración de } p\text{-NP } (\mu\text{mol/mL}) = \left(\frac{\text{Abs 420 nm}}{12.403} \right)$$

9.1.2 Curva de calibración de Bradford para cuantificación de proteína



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

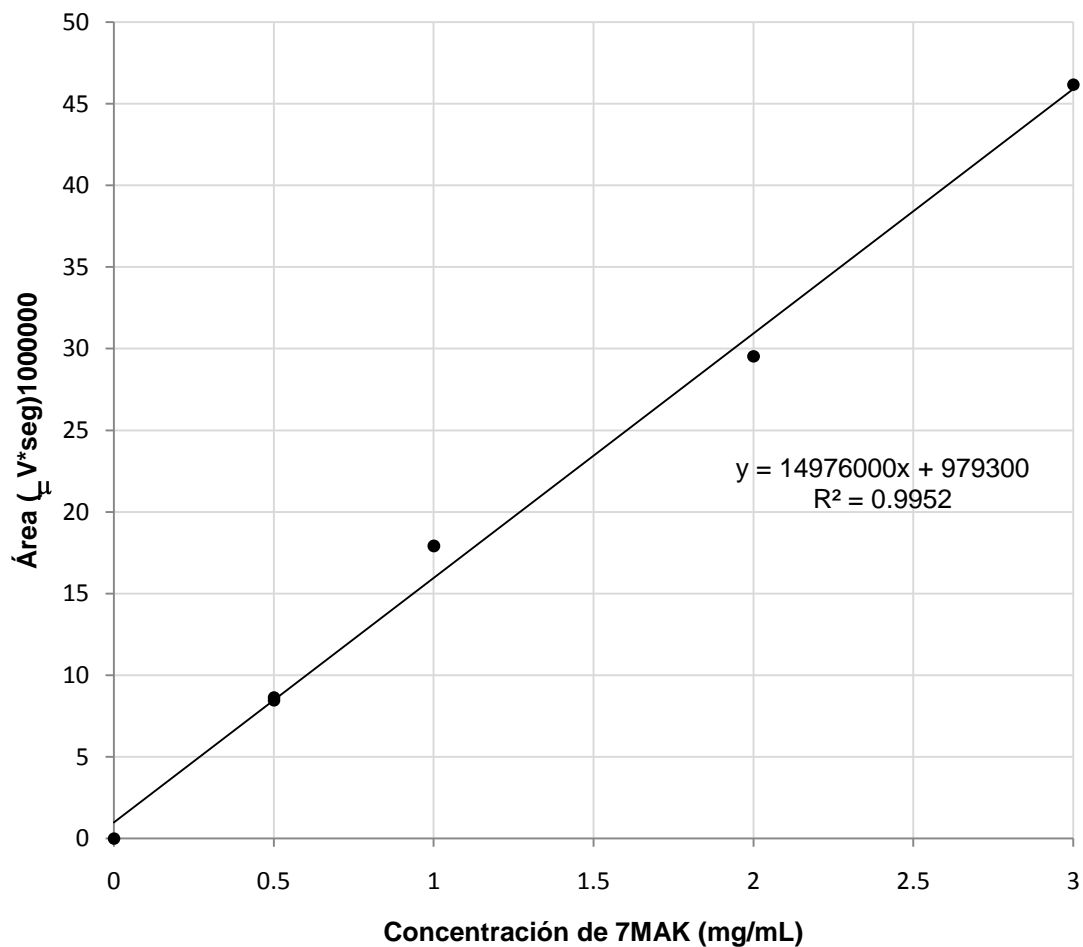
Se obtuvo la ecuación de la recta:

$$\text{Abs 595 nm} = 0.0466 \times (\text{Concentración de proteína}) + 0.01$$

De la cual:

$$\text{Concentración de proteína } (\mu\text{g/mL}) = \left(\frac{\text{Abs 595 nm} - 0.01}{0.0466} \right)$$

9.1.3 Curva de calibración HPLC para la cuantificación de 7-O-lauroilo de ácido kójico



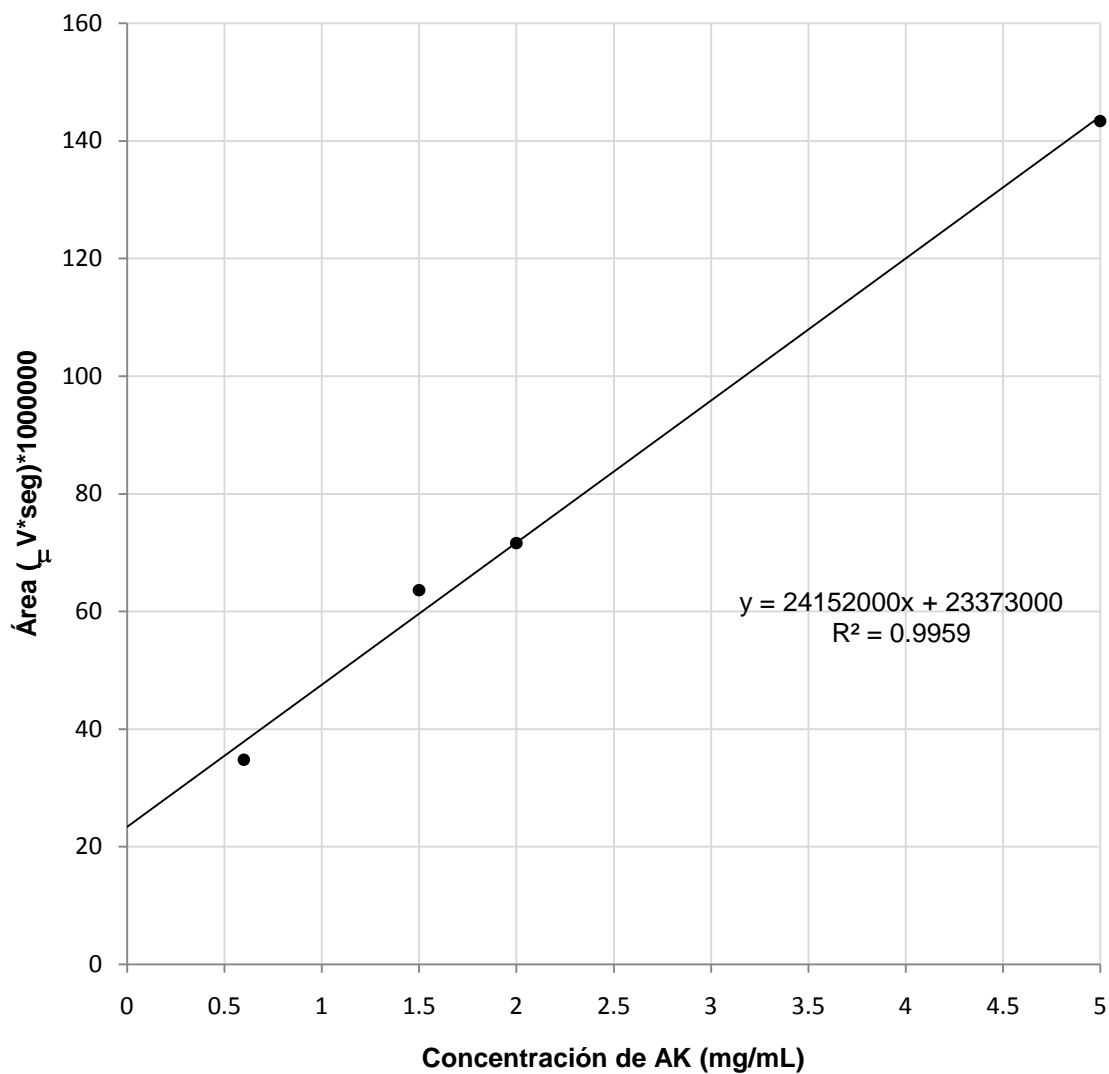
La ecuación de la recta es:

$$\text{Área} = 14976000 \times (\text{Concentración de 7MAK}) + 979300$$

De la cual:

$$\text{Concentración de 7MAK (mg/mL)} = \left(\frac{\text{Área} - 979300}{14976000} \right)$$

9.1.4 Curva de calibración HPLC para la cuantificación de ácido kójico



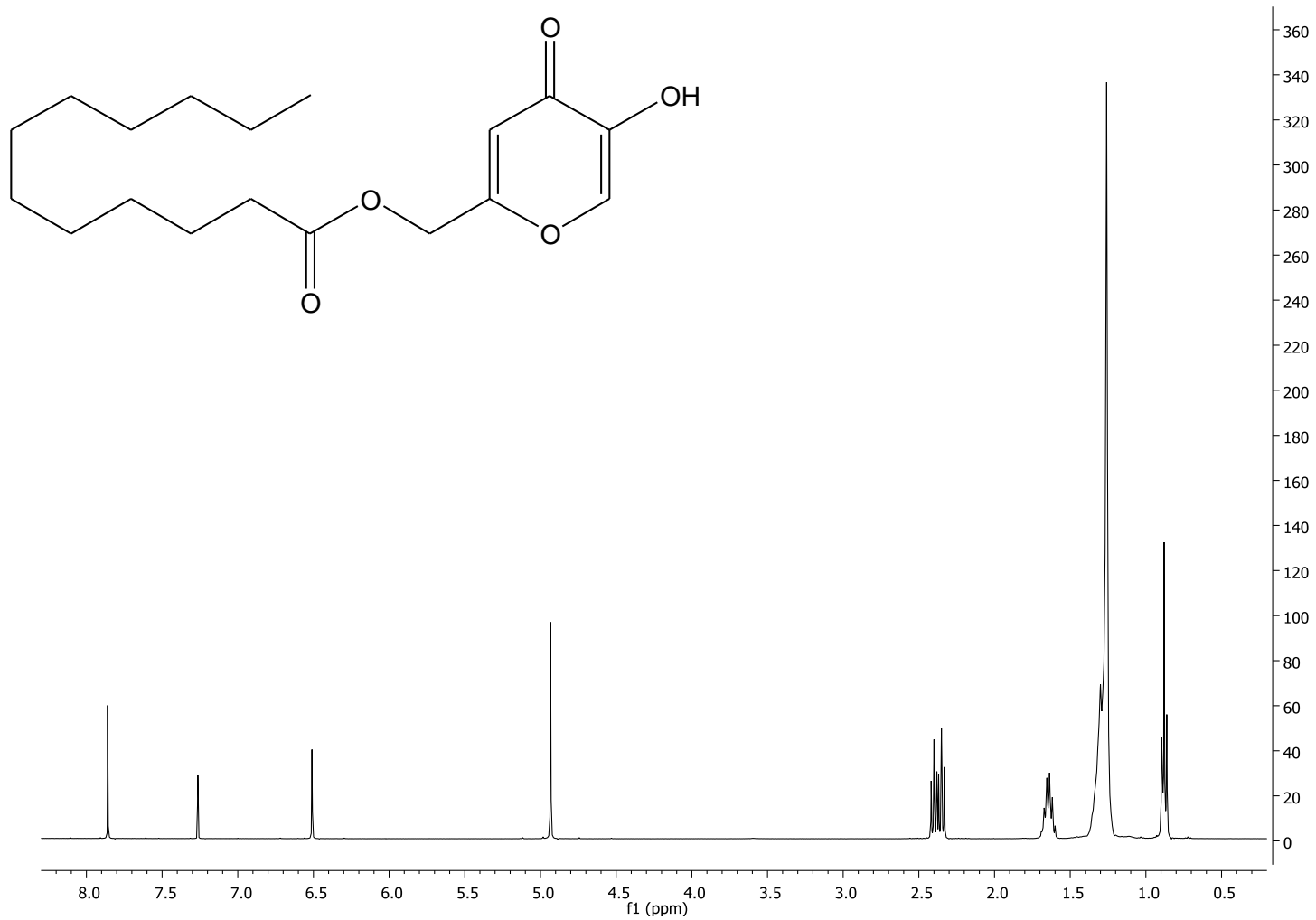
Se obtuvo la ecuación de la recta:

$$\text{Área} = 24152000 \times (\text{Concentración de AK}) + 23373000$$

De la cual:

$$\text{Concentración de AK (mg/mL)} = \left(\frac{\text{Área} - 23373000}{24152000} \right)$$

9.2 Espectro de RMN del 7-O-lauroilo de ácido kójico



Espectro RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) 7MAK